Analytik und Stabilität hydrierter Mutterkornalkaloide

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Axel Walter
aus Marne

1975

1974

75 65

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0013

Analytik und Stabilität hydrierter Mutterkornalkaloide

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Axel Walter
aus Marne

1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 1974

Dekan: Professor Dr. H. Auterhoff
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Graf

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meiner Frau Gudrun

Die vorliegende Arbeit wurde im September 1972 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im September 1974 abgeschlossen.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. H. Auterhoff,
danke ich für die Anregungen und die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

E i n l e i t u n g 1

Dünnschichtchromatographie der Peptidalkaloide 5
a) Chromatographie auf Kieselgel F_{254} 7
b) Chromatographie auf Aluminiumoxid T 13
c) Chromatographie auf Polyamid 13
d) Chromatographische Trennung des Dihydroergotoxins ... 15

Quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten des Dihydroergotoxins 20

UV-Spektren der Lösungen von Dihydroergocristin und Ergocristin 35

Literaturangaben über die Stabilität von Mutterkornalkaloiden und einige Stabilitätsuntersuchungen 40

Verfärbungen einiger Alkaloidlösungen unter äußeren Einflüssen 45

Dünnschichtchromatographie der durch Licht- bzw. Hitzeeinwirkung entstandenen Alkaloidgemische 48

UV-Absorptionsspektren zersetzter Alkaloidlösungen 53

Quantitative Bestimmungen der Zersetzungsprodukte und Untersuchungen zu ihrer Struktur 67

Veränderungen am Molekül des Peptidalkaloids nach Sonnenlichtbestrahlung 75

Zersetzung des Dihydroergocristins und des Dihydroergotoxinmethansulfonats bzw. Hydergins^{R} in der Hitze 95

Strukturelle Aufklärung chromatographisch erfaßter Zersetzungsprodukte nach dem Erhitzen 102

Zersetzungsprodukte Z_1 und Z_2 105
Restalkaloid A 118
Zersetzungsprodukt Z_3 126

Analyse der Hydergin^R-Tropfen 131

Abbau stabilisierter Lösungen bei 100 ^{o} 133

Z u s a m m e n f a s s u n g 137

B e s c h r e i b u n g d e r V e r s u c h e 139

E i n l e i t u n g

Die erste gezielte Verwendung fand das Mutterkorn Ende des 16. Jahrhunderts, als eine Kenntnis der Alkaloide noch nicht vorhanden war. Bis zu dieser Zeit hatte die Droge eine faszinierende Geschichte, in deren Verlauf sie vor allem als Giftträger auftrat (" morbus epidemicus convulsivus; ignis sacer ").

Heute reicht das Wirkungsspektrum der Mutterkornalkaloide von der Geburtshilfe (Methergin^{R}) über die innere Medizin (Hydergin^{R}) bis in die Psychiatrie (LSD) hinein. Das Europäische Arzneibuch hat Ergometrinmaleat und Ergotamintartrat aufgenommen.

Es war eine Aufgabe dieser Arbeit, praktikable analytische Methoden, insbesondere der Chromatographie, für die Alkaloide des Dihydroergotoxins zu finden. Die therapeutische Bedeutung dieser Alkaloide liegt auf den Gebieten der Hypertonie und der Migräne. Sie sind sympathikolytisch 3 - 4 mal wirksamer und dabei weniger toxisch als z. B. das natürliche Alkaloid Ergotamin.

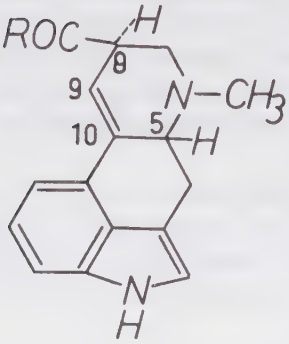
Eine weitere Aufgabe war die Untersuchung der Stabilität. Die bekannten chemischen Abwandlungsprodukte erwiesen sich im Vergleich zu den natürlichen Mutterkornalkaloiden meist als stabiler, ihr Wirkungsspektrum ist aber weniger breit [1)].

---

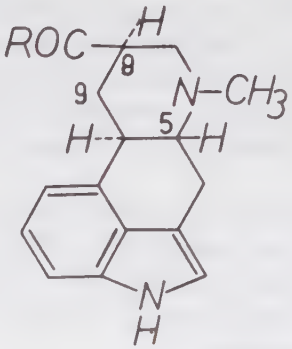
1) A. Hofmann, Die Mutterkornalkaloide, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1964, S. 178

Die gebräuchlichen Mutterkornalkaloide sind säureamidartige Derivate der 5 R, 8 R Lysergsäure:

a) natürliche Alkaloide



b) hydrierte Alkaloide



R = Zyklischer Peptidrest
(Ergotoxin - Gruppe,
Ergotamin - Gruppe)

R = Aminoalkoholrest
(Ergobasin)

Für die Arbeit über Δ 9-10 hydrierte Peptidalkaloide standen von den säureamidartigen Verbindungen zur Verfügung: Dihydroergotoxinmethansulfonat *, Dihydroergocristin ** und Dihydroergotaminmethansulfonat ***.

---

* Fa. Dr. R. Pfleger, Bamberg
** Fa. Sigma, Hamburg
*** Fa. Roth, Karlsruhe

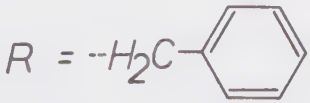
Dihydroergotoxin enthält drei Komponenten:

Dihydroergocristin
Dihydroergokryptin
Dihydroergocornin

Dihydroergotoxin *

Die Alkaloide des Dihydroergotoxinkomplexes enthalten übereinstimmend im Peptidteil die maskierte Dimethylbrenztraubensäure und L - Prolin, während die zweite Aminosäure variabel ist.

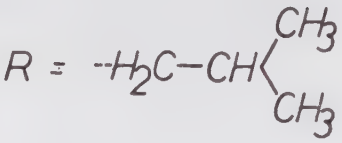
Dihydroergocristin (Mol. - Gew. 611,7)
variable Aminosäure: L - Phenylalanin



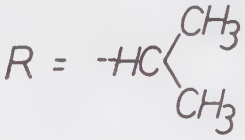
---

* Ich danke der Firma Dr. R. Pfleger, Bamberg, für die Überlassung von Dihydroergotoxinmethansulfonat.

Dihydroergokryptin (Mol. - Gew. 577,6)
variable Aminosäure: L - Leucin



Dihydroergocornin (Mol. - Gew. 563,7)
variable Aminosäure: L - Valin



Dünnschichtchromatographie der Peptidalkaloide.

Die chromatographische Trennung der Mutterkornalkaloide ist schwierig, da die Alkaloide sehr ähnliche Eigenschaften haben. So unterscheiden sich Ergocornin und Ergokryptin bei dem Mol.-Gew. von fast 600 nur durch eine Methylengruppe.

Zwischen den natürlichen und den hydrierten Alkaloiden besteht der Unterschied, daß der Lysergsäureteil der natürlichen Alkaloide durchgehend von C - 8 über C - 9 bis C - 10 nach C - 11 mit dem Phenylring des Indolsystems konjugiert ist. Die olefinische Doppelbindung in Δ 9 - 10 verändert die Polarität des Moleküls und damit seine Haftfähigkeit auf der chromatographischen Platte.

Für die chromatographischen Untersuchungen standen folgende Alkaloide zur Verfügung:
Dihydroergotoxinmethansulfonat, Ergotoxin, Dihydroergocristin, Dihydroergokryptin *, Dihydroergotamin, Ergocristin und Dihydrolysergsäure **.

Da das Gemisch freier Basen chromatographiert werden muß, wurden diese aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von Ammoniak (pH9) mit Chloroform ausgeschüttelt. Man arbeitet unter Stickstoff, um eventuelle Zersetzung an der Luft zu vermeiden.

---

* Eigene Darstellung durch Hydrierung aus Ergokryptin (Helv. chim. Acta 26, 2079 (1943)).

** Eigene Darstellung aus Dihydroergotamin durch alkalische Hydrolyse (Helv. chim. Acta 26, 2079 (1943)).

Nach dem Trocknen bei 100 Torr und 40° erhielt man ein hellbraunes Produkt. Die Peptidalkaloide lassen sich nicht quantitativ umkristallisieren [2]. Daher wurde das Alkaloid-Gemisch in Benzol gelöst und mit Cyclohexan als amorpher Niederschlag gefällt. Nach dem Trocknen und Chromatographieren zeigte sich, daß das auf diese Weise erhaltene Dihydroergotoxin wesentlich reiner war und auf dem Chromatogramm nur einen Fleck gab.

Die den natürlichen Alkaloiden eigene Fluoreszenz aufgrund des konjugierten Systems im Lysergsäureteil tritt bei den hydrierten nicht auf. Zu ihrer Detektion kann die van Urk-Reaktion herangezogen werden.

Die Färbung nach dem Besprühen der Lösung aus 4 - Dimethylaminobenzaldehyd in Cyclohexan ist bei den Alkaloiden nicht immer einheitlich (Färbung: hellrosa bis violett - blau). Es kommt darauf an, das Reagens möglichst gleichmäßig und in geringer Menge auf die Platte zu sprühen.

Nach einer Anregungszeit von 20 Min. lassen sich auch die hydrierten Alkaloide mit einem Quecksilberniederdruckbrenner zu einer blauen Eigenfluoreszenz [3] anregen.

Auf Chromatographieplatten mit Eigenfluoreszenz (F_{254}) werden die Δ 9 - 10 hydrierten Alkaloide durch Fluoreszenzlöschung als blaue und die Δ 9 - 10 ungesättigten als deutlich hellblau leuchtende Flecke sichtbar. Visuell sind sie noch bis 0,1 γ wahrnehmbar, mit der van Urk-Reaktion lassen sich noch 0,05 γ sichtbar machen.

---

2) Helv. chim. Acta 26, 2081 (1943)
3) Arch. Pharmaz. 297, 186 (1964)

Von der Fluoreszenz her kann man daher auf einem Adsorbens ohne Fluoreszenzindikator die natürlichen Alkaloide von den hydrierten unterscheiden:

Alkaloide, Δ 9 - 10 ungesättigt: helle Eigenfluoreszenz
Alkaloide, hydriert: nach Anregung mit intensivem UV-Licht schwach blaue Fluoreszenz.

Als Adsorptionsmittel wurden Kieselgel F_{254} (Merck), Aluminiumoxid T (Merck) und Polyamid (Merck) verwendet. Grundsätzlich wurde mit einem Fließmittel in ungesättigten Trogkammern (S - Kammern) entwickelt.

a) Chromatographie auf Kieselgel F_{254}:

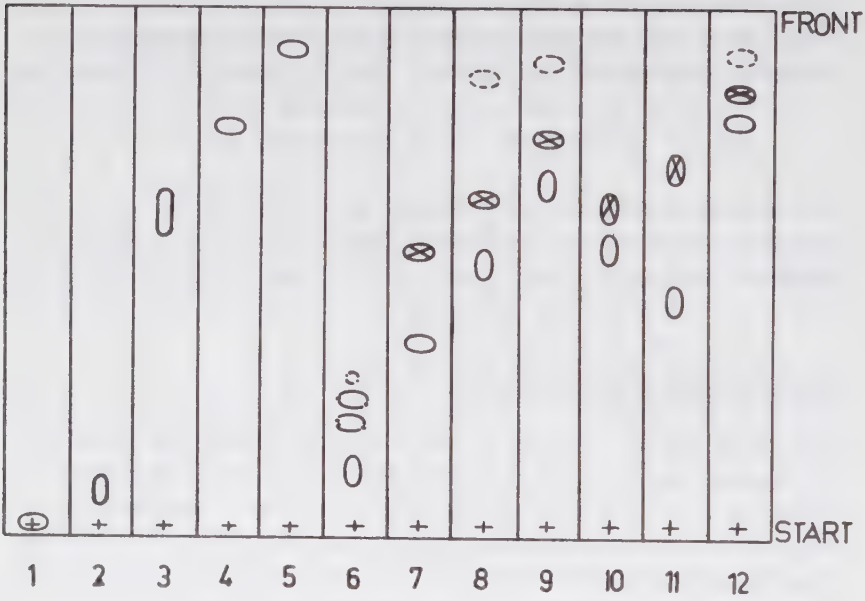
Bei lipophilen Fließmitteln der eluotropen Reihe wie n-Heptan bleibt das Alkaloidgemisch am Startpunkt. Der hydrophilere Essigsäureäthylester zieht Dihydroergotoxin auf der schwach sauren Kieselgelplatte auseinander. Bei Zusatz von Diäthylamin wandert das Alkaloidgemisch als ein Fleck an die Front. Es lag nahe, diese Fließmittel zu kombinieren. Man kommt so zunächst zu den für die Trennung der Δ9-10 hydrierten Alkaloide wichtigen Fließmittelkombinationen aus:
Cyclohexan, n - Heptan, Chloroform, Essigsäureäthylester und Diäthylamin.

Eine Trennung war allerdings bei der Dihydroergotoxingruppe unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Mit verhältnismäßig einfachen Fließmittelkombinationen waren dagegen die natürlichen Alkaloide von den hydrierten zu trennen.

Eine Übersicht zeigt, wie sich Dihydroergotoxin bei einigen charakteristischen Fließmitteln auf Kieselgel verhält. Ferner sind Trennungen des hydrierten Alkaloidgemisches Dihydroergotoxin vom natürlichen Ergotoxin und Ergocristin sowie Ergo-

cristinin dargestellt:



Dihydroergotoxin ⊖
Ergotoxin ⊂
Ergocristin ⊗
Ergocristinin ◌
(Laufhöhe: 18 cm)

Als mobile Phasen in den Bahnen 1 - 12 dienten:

1 = n-Heptan
2 = Essigsäureäthylester
3 = Isopropanol
4 = Diäthylamin
5 = Pyridin
6 = Essigsäureäthylester 50 + n-Heptan 50

7 = Äthanol 10 + Chloroform 90
8 = Essigsäureäthylester 50 + Isopropanol 50
9 = Isopropanol 50 + Chloroform 50
10 = Isopropanol 50 + Butanol 50
11 = Essigsäureäthylester 90 + Äthanol 10
12 = Essigsäureäthylester 50 + Methanol 50

Die beste Auflösung wird mit den Fließmitteln Äthanol 10 und Chloroform 90 (Bahn 7) sowie Essigsäureäthylester 50 und Isopropanol 50 (Bahn 8) erreicht.

Die aufgrund der olefinischen Bindung im Lysergsäureteil (C - 9; C - 10) polareren, ungesättigten Alkaloide zeigten in diesen Fließmitteln schwächere Adsorption am Kieselgel und damit größere Rf-Werte. Bei längerem Aufbewahren von Ergocristin in Chloroform tritt neben der Normal- auch die Isoform auf, die sich chromatographisch unterscheiden lassen. Dabei laufen die Normalverbindungen aufgrund äquatorialer Anordnung des Substituenten am C - 8 und damit größerer Haftfähigkeit [4] langsamer als die Isoverbindungen.

Im einzelnen können die Fließmittel nach der " Aufenthaltswahrscheinlichkeit [5] " des Alkaloids in der mobilen Phase wie folgt eingeordnet werden.

1. Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der mobilen Phase gering bei: n-Heptan, Benzol, Toluol und Methylenchlorid.

---

4) A. Hofmann, Die Mutterkornalkaloide, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1964, S. 48

5) F. Geiss, Die Parameter der Dünnschichtchromatographie, Verlag Vieweg und Sohn, Braunschweig 1972

2. Bessere Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der mobilen Phase bei: Essigsäureäthylester, Triäthylamin und Chloroform.

3. Große Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Alkaloids in der mobilen Phase bei: Pyridin, Diäthylamin, Äthanol und Methanol.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen lassen sich folgende, einfache Fließmittelkombinationen zur schnellen Unterscheidung hydrierter und natürlicher Alkaloide verwenden:

Gemisch 1: Essigsäureäthylester 50 + n-Heptan 50
Rf-Wert Dihydroergotoxin < Rf-Wert Ergotoxin

Gemisch 2: Äthanol 10 + Chloroform 90
Rf-Wert Dihydroergotoxin < Rf-Wert Ergotoxin

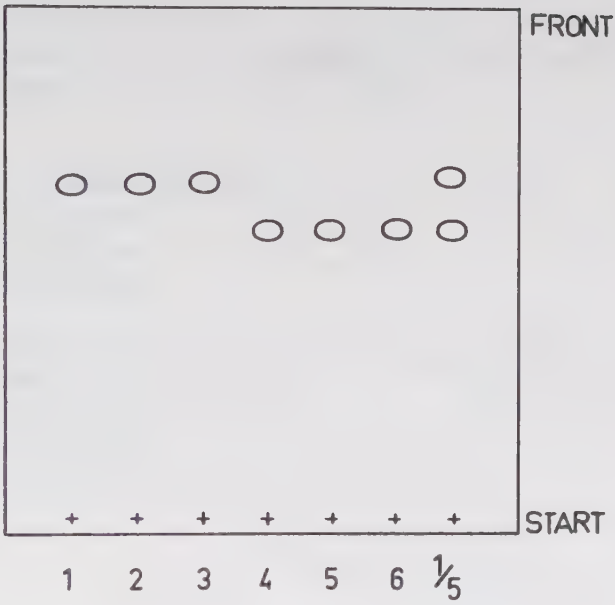


Abb. 1: Fließmittel Äthanol 10 + Chloroform 90,
Adsorbens Kieselgel F_{254}, Laufhöhe 10 cm

1 = Ergocristin
2 = Ergokryptin
3 = Ergotoxin
4 = Dihydroergokryptin
5 = Dihydroergocristin
6 = Dihydroergotoxin
1/5 = Ergocristin u. Dihydroergocristin

Gemisch 3: Essigsäureäthylester 50 + Isopropanol 50

Gemisch 4: Isopropanol 50 + Chloroform 50
Die Gemische 3 + 4 trennen die Normal- und Isoform der natürlichen Alkaloide.

Gemisch 5: Diäthylamin 50 + n-Heptan 50

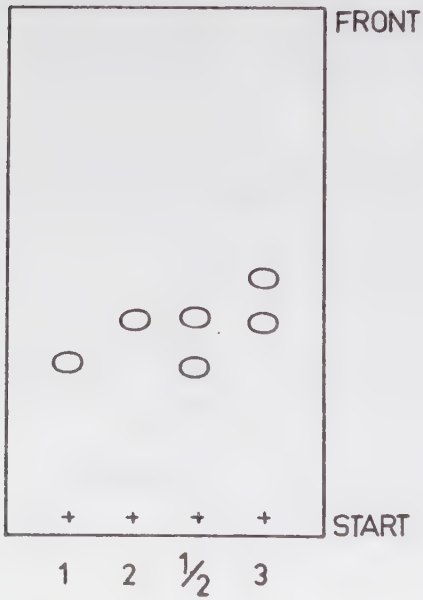


Abb. 2: Fließmittel Diäthylamin 50 + n-Heptan 50, Adsorbens Kieselgel F_{254}, Laufhöhe 10 cm

1 = Dihydroergocristin
2 = Dihydroergokryptin
1/2 = Dihydroergocristin u. Dihydroergokryptin
3 = Dihydroergotoxin

Dihydroergocristin (Rf = 0,30) und Dihydroergokryptin (Rf = 0,40) sind gut voneinander zu trennen.

Dihydroergotoxin läßt sich in zwei Flecke auftrennen, die aber nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Wahrscheinlich beeinflussen sich die drei Alkaloide des hydrierten Gemisches gegenseitig so stark, daß sie weiter transportiert werden als ein Zweikomponentengemisch aus derselben Gruppe.

b) Chromatographie auf Aluminiumoxid T:

Mit Diäthylamin auf Aluminiumoxid TF_{254} lassen sich Dihydroergotoxin, Ergocristin, Ergotoxin, Dihydroergotamin und Dihydrolysergsäure gut unterscheiden (Abb. 3).

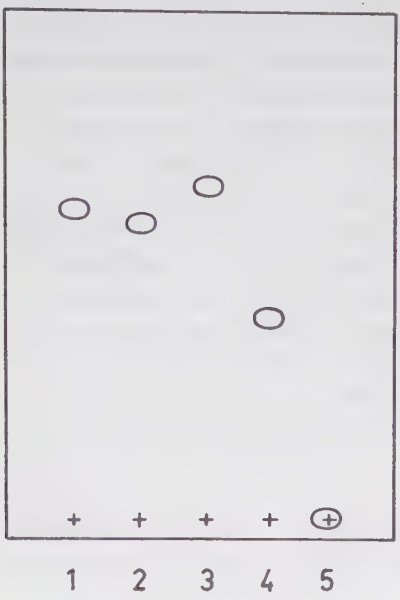


Abb. 3: Fließmittel Diäthylamin, Adsorbens Aluminiumoxid TF_{254}, Laufhöhe 10 cm

1 = Dihydroergotoxin
2 = Ergocristin
3 = Ergotoxin
4 = Dihydroergotamin
5 = Dihydrolysergsäure

c) Chromatographie auf Polyamid:

Entsprechende Untersuchungen einer Dreifachtrennung des hydrierten Ergotoxins auf Polyamidfolien führten zu keiner Trennung. Obwohl Isopropanol, Chloroform und Methylenchlorid das Alkaloidgemisch im Rf-Bereich mit der größten Trennleistung stark auseinanderzogen, war es nicht möglich, durch Kombination mit n-Heptan oder Diäthylamin eine Auflösung zu erreichen.

Die bisherigen Ergebnisse lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß eine Trennung des Dihydroergotoxinkomplexes in seine Einzelkomponenten Dihydroergocristin, Dihydroergokryptin und Dihydroergocornin auf den eingesetzten Adsorbentien nicht möglich ist.

Die natürlichen Peptidalkaloide des Ergotoxins lassen sich mit Äthanol 10 und Chloroform 90, Essigsäureäthylester 50 und Isopropanol 50 von dem entsprechenden hydrierten Ergotoxinkomplex auf Kieselgel F_{254} unterscheiden und identifizieren. Die Detektion erfolgt durch Besprühen mit van Urk-Reagens oder Fluoreszenzlöschung bei 254 nm. Die Iso- und Normalformen der natürlichen Alkaloide lassen sich trennen.

Auf Aluminiumoxid TF_{254} gelingt die Trennung von Dihydroergotoxin, Ergocristin, Ergotoxin und Dihydroergotamin. Dihydrolysergsäure bleibt wegen des basischen Fließmittels am Start liegen.

d) Chromatographische Trennung des Dihydroergotoxins:

Die chromatographische Dreifachtrennung des Dihydroergotoxins ist aufgrund der Ähnlichkeit der Moleküle bei großem Molekulargewicht besonders schwierig.Dies bestätigen auch die spärlichen Literaturangaben [6]. Die dort beschriebenen Dreifachtrennungen auf Zelluloseplatten haben folgende mobile Phase: Essigester 5 T, n-Heptan 6 T und Diäthylamin 0,02 T. Die genannten Autoren schlagen vor, das verwendete " Zellulosepulver zur analytischen Chromatographie " vor dem Ausstreichen mit einer 15 proz. (v / v) Lösung von Formamid in Aceton zu imprägnieren.

Dem gegenüber sollten die folgenden Untersuchungen eine Dreifachtrennung des hydrierten Alkaloidgemisches auf nicht imprägnierten Zelluloseplatten erreichen.

Zunächst wurden die Fließeigenschaften des Dihydroergotoxins bei n-Heptan, Essigsäureäthylester, Diäthylamin und Formamid getrennt voneinander in Zylinderkammern (S - Typ) untersucht. Dabei wurden folgende Fließeigenschaften des Alkaloidgemisches festgestellt:

n-Heptan:	Alkaloid bleibt am Startpunkt liegen.
Essigsäureäthylester:	Alkaloid wird im mittleren Rf-Bereich auseinandergezogen.
Diäthylamin:	Alkaloid wandert an die Front.
Formamid:	Alkaloid bleibt am Startpunkt liegen.

---

6) Arch. Pharmaz. 297, 187 (1964)
Egon Stahl, Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag, Berlin 1967, S. 433

Als Adsorbens dienten Celluloseplatten F_{254} (Merck), deren Beschichtung so homogen ist, daß eine spektralphotometrische Gehaltsbestimmung durchgeführt werden kann. In weiteren Schritten sollte die stationäre Phase, das Formamid, ersetzt werden; gleichzeitig mußten die einzelnen Fließmittel der in der Literatur vorgeschlagenen mobilen Phase zur Trennung von Dihydroergotoxin ausgetauscht werden. Dafür boten sich u. a. Methylenchlorid (breite Streifenbildung), Pyridin und Isopropanol an, deren Kombination zu binären und ternären Gemischen in gesättigten Trogkammern (N-Typ) aber keine Trennung brachten. Die weiteren Untersuchungen richteten sich nach den Vorschlägen zur Trennoptimierung nach F. Geiss [7].

Es wurden Fließmittel verwendet, die das Alkaloidgemisch im Rf-Bereich 0,3 hielten. Über die Aktivität der Platte wurde durch einen Feuchtegradienten eine Trennung mit der Vario-KS-Kammer versucht. Zur Ermittlung binärer Gemische wurde in der gleichen Kammer mit der einen Komponente vorbedampft, während die andere als mobile Phase diente. Bei zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten war es nicht möglich, bei aktiviertem oder feuchtebeladenem Adsorbens, bei saurem oder alkalischem Bedampfungsmittel, eine Trennung des Alkaloidgemisches zu erreichen.

Als letzte Möglichkeit blieb, das in der Literatur vorgeschlagene System auf käufliche Celluloseplatten zu übertragen. Das Adsorbens wird mit einer Lösung von Formamid in Aceton (15 proz. v / v) imprägniert. Die Zeit des Eintauchens sowie des Trocknens mit Kaltluft muß zwecks reproduzierbarer Ergebnisse zeitlich genau eingehalten werden.

---

7) F. Geiss, Die Parameter der Dünnschichtchromatographie, Vieweg Verlag, Braunschweig 1972, S. 264

Die Rf-Werte sind auf der gleichen Platte konstant, jedoch von Versuch zu Versuch auch bei noch so sorgfältiger Imprägnierung nicht immer einheitlich. Trägt man 1 - 2γ Gesamtalkaloid auf, so erhält man in jedem Fall bei sorgfältigem Arbeiten eine Trennung mit folgenden Rf-Werten im optimalen Bereich (aufgeführt werden für jedes Alkaloid die extremen Rf-Werte):

Dihydroergokryptin	0,31 - 0,21
Dihydroergocornin	0,29 - 0,22
Dihydroergocristin	0,23 - 0,17

Die Abbildung der Remissionsortskurve, aufgenommen mit einem Spektralphotometer bei 285 nm, zeigt die Auflösung von 2γ aufgetragenen Dihydroergotoxins.

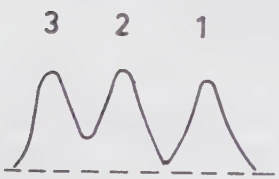


Abb. 4: Remissionsortskurve von Dihydroergotoxin bei 285 nm
1 = Dihydroergokryptin
2 = Dihydroergocornin
3 = Dihydroergocristin
(-)= Remissionsuntergrund

Die Platte war mit Formamid imprägniert. Als mobile Phase diente: n-Heptan 65, Essigsäureäthylester 30 und Diäthylamin 5. Dihydroergokryptin mit dem größten Rf-Wert (s. Abb. 5) setzt sich klar von den beiden anderen Alkaloiden ab. Das ist überraschend, weil sich Dihydroergocornin und Dihydroergokryptin nur durch eine Methylengruppe unterscheiden, während Dihydroergocristin im Peptidteil an Stelle von L-Valin bzw. L-Leucin L-Phenylalanin trägt.

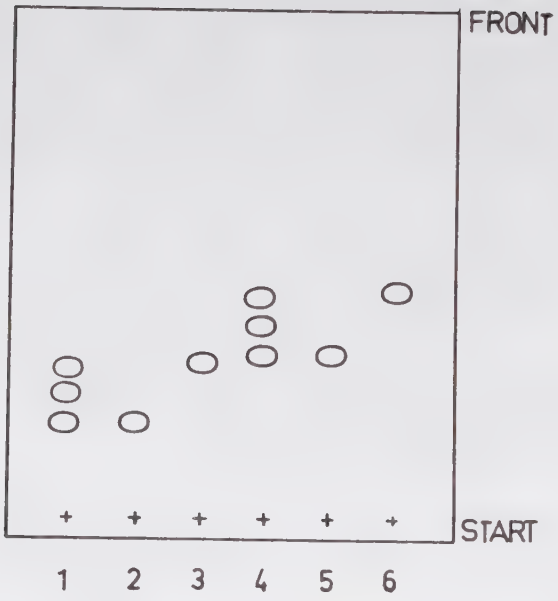


Abb. 5: Chromatographische Trennung Dihydroergotoxin und Ergotoxin.
Adsorbens: Zellulose F_{254} (Merck)
mobile Phase: n-Heptan 65, Essigsäureäthylester 30, Diäthylamin 5
Formamid imprägniert, Laufhöhe 15 cm.

1 = Dihydroergotoxin
2 = Dihydroergocristin
3 = Dihydroergokryptin
4 = Ergotoxin
5 = Ergocristin
6 = Ergokryptin

Die nicht bezifferten Flecke sind Dihydroergocornin bzw. Ergocornin.

Das Ergebnis der Untersuchung zur chromatographischen Trennung des hydrierten Alkaloidgemisches Ergotoxin auf fertigen Celluloseplatten läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

Eine Trennung ist nur möglich mit der mobilen Phase der Zusammensetzung n-Heptan 65, Essigester 30 und Diäthylamin 5. Entgegen den Literaturangaben sind die n-Heptan- und Diäthylamin-Anteile wesentlich höher, während dementsprechend der Anteil an Essigsäureäthylester für eine optimale Trennleistung geringer geworden ist. Bei Veränderung der Zusammensetzung des Fließmittels laufen die Alkaloidflecke leicht ineinander, so daß man die Mengenverhältnisse genau berücksichtigen muß.

Die Dihydrolysergsäure bleibt aufgrund des alkalischen (Diäthylamin) Fließmittels am Startpunkt liegen. Die natürlichen Alkaloide der Ergotoxingruppe haben folgende mittlere Rf-Werte:

Ergokryptin	0,42
Ergocornin	0,37
Ergocristin	0,30

Eine Verunreinigung eines hydrierten Alkaloidgemisches mit ungesättigten Alkaloiden der Ergotoxingruppe liegt vor, wenn in diesem System oberhalb des Rf-Wertes von 0,3 bei 254 nm durch Fluoreszenzlöschung hellere Flecke nachweisbar sind.

Quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten des Dihydroergotoxins.

Die bisher in der Literatur aufgezeichneten Verfahren zur quantitativen Bestimmung hydrierter Mutterkornalkaloide sind im allgemeinen photometrischer Art.

So wurde das Alkaloidgemisch Dihydroergotoxin nach mehrjähriger Lagerung papierchromatographisch getrennt, die einzelnen Alkaloide Dihydroergocristin, Dihydroergocornin und Dihydroergokryptin vom Adsorbens gelöst und der Gehalt der Lösungen photometrisch bestimmt [8].

Über Eichkurven reiner Substanzen läßt sich feststellen, wieviel unzersetztes, hydriertes Alkaloid dann in einer Lösung vorliegt.

Es stellt sich die Frage, ob aus Dünnschichtchromatogrammen direkt eine quantitative, spektralphotometrische Bestimmung der Einzelalkaloide der Δ 9 - 10 hydrierten Ergotoxingruppe möglich ist. Sie hätte den Vorzug, daß neben kürzerer Laufzeit des Fließmittels (45 Min.) es nicht mehr nötig wäre, die Alkaloide aus dem Papier zu extrahieren. Dabei sollte untersucht werden, welche Vorteile eine spektralphotometrische Bestimmung im UV-Bereich (Alkaloide sichtbar durch Fluoreszenzlöschung) gegenüber einer Messung im sichtbaren Bereich (Alkaloide durch van Urk violett - blau gefärbt) bietet.

---

8) Arch. Pharmaz. 289, 324 (1956)
Pharmac. Acta Helvetiae 36, 472 (1961)

Sinnvoll für Stabilitätsuntersuchungen werden diese Bestimmungen nur dann, wenn man das Dihydroergotoxingemisch vorher von eventuell auftretenden Zersetzungsprodukten abtrennt, denn mit Hilfe der van Urk-Reaktion werden alle Lysergsäurederivate als Abkömmlinge des Indols erfaßt. Zersetzungsprodukte aus dem Peptidteil können auf diese Weise nicht bestimmt werden.

Im folgenden Verfahren wurde mit einem Spektralphotometer mit der Geräteanordnung M - Pr die Fluoreszenzminderung im UV- und im sichtbaren Bereich gemessen.

In Vorversuchen wurde die Einstellung des Spektralphotometers dem System angepaßt. Da die Dünnschichtplatte imprägniert ist, erfährt das über den Photomultipler auf die Probe gestrahlte Licht im sichtbaren- wie im UV-Bereich eine starke Diffusion. Daher zeichnet der Schreiber die Kurven kleinflächig auf, und es ist notwendig, mit möglichst großem Spalt (0,8) zu arbeiten.

Mit Hilfe des reinen, kristallinen Dihydroergocristins wurde die Wellenlänge im UV- und sichtbaren Bereich ermittelt, bei der der Abstand zwischen dem Remissionsmaximum und dem Remissionsgrad des Untergrundes am größten war. Im UV-Bereich gilt dies für 285 nm und im sichtbaren Bereich für 560 nm.

Für die Reproduzierbarkeit dieser Methode ist es wichtig, daß die Platte standardisiert wird. Nach der Imprägnierung in der Formamid-Acetonlösung durch Eintauchen wird das Aceton unter Kaltluft mehrere Minuten abgefönt. Anschließend wird die Platte im Trockenschrank aktiviert.

Die Alkaloide werden mit Hilfe einer Aglaspritze so aufgetragen, daß 0,1γ mindestens 1 nl entspricht und der Durchmesser der

aufgetragenen Flecke 2 mm nicht überschreitet. Danach wird in einer gesättigten Trogkammer bei einer Laufhöhe von 15 cm und einer Laufzeit von 45 Min. chromatographiert. Nachdem die Zelluloseplatte mit Kaltluft behandelt worden ist, wird im Trockenschrank bei 50 ^{o} eine Viertelstunde getrocknet. Nach dem Fönen wird die Platte zur Anfärbung der Alkaloide mit dem van Urk - Reagens in eine mit Salzsäuredämpfen gesättigte Trogkammer gestellt. Nach 5 Min. sind die Alkaloide als violette Flecke sichtbar. Wird die Platte zu stark besprüht, so verfärbt sich der imprägnierte Untergrund zusehends, und die Auflösung wird scheinbar verschlechtert. Nach dem Einwirken der Salzsäuredämpfe ist die Celluloseschicht gleichmäßig gelb gefärbt, so daß der Remissionsuntergrund vom Schreiber des Spektralphotometers nicht stufenförmig aufgezeichnet wird.

Die Remissionsortskurven haben annähernd die Form einer Glocke.

Der Unterschied der Alkaloidkomponenten des Gemisches Dihydroergotoxin ist so gering, daß man davon ausgehen kann, daß sie bei den Wellenlängen 285 nm bzw. 560 nm die gleichen Absorptionen haben. Dieses hat auch die Untersuchung von Dihydroergocristin und Dihydroergokryptin als Reinsubstanzen bestätigt. So ist anzunehmen, daß dies auch für Dihydroergocornin * gilt.

Die in Vorversuchen erhaltenen Meßwerte zeigen, wie groß die Fehlergrenzen zu Beginn der Arbeit waren und wie weit die Bestimmung reproduzierbar wird, wenn man außer der Standardisierung bei der Vorbereitung zur Chromatographie noch zusätz-

---

* Reines Ergocornin stand als Ausgangskomponente für eine Hydrierung nicht zur Verfügung.

lich bestimmte Bedingungen einhält. Bei der praktischen Durchführung der quantitativen Bestimmung der Anteile Dihydroergocristin, Dihydroergocornin und Dihydroergokryptin in dem Alkaloidgemisch Dihydroergotoxin wurden mehrere Meßreihen im UV - (285 nm) und im sichtbaren Bereich (560 nm) durchgeführt. Zunächst wurde anhand der Auflösung der Remissionsortskurven festgestellt, wieviel γ Dihydroergotoxin zweckmäßiger Weise für die Bestimmung auf die Platte aufgetragen werden mußten.

Die einzelnen Meßreihen wurden miteinander verglichen, um die Reproduzierbarkeit des Systems festzustellen.

Als reine Vergleichssubstanz stand Dihydroergocristin zur Verfügung. Zu jeder quantitativen Erfassung der Alkaloide des Dihydroergotoxingemisches wurden Eichkurven mit Dihydroergocristin aufgestellt.

Voraussetzung für die quantitative Bestimmung von Dihydroergocristin, Dihydroergocornin und Dihydroergokryptin ist die Trennung von Dihydroergotoxin. Rein visuell getrennte Substanzen sind aber bei diesem spektralphotometrischen Verfahren nicht immer ausreichend aufgelöst. Es war daher notwendig, vorerst einige Remissionsortskurven zu vergleichen. Dabei wurde ermittelt, wieviel γ Gesamtalkaloid für eine optimale Auflösung auf die Dünnschichtplatte aufgetragen werden mußten.

Eingesetzt wurden zunächst 1 - 2 γ Gesamtalkaloid:

1. Remissionsortskurven * aufgenommen bei 285 nm.

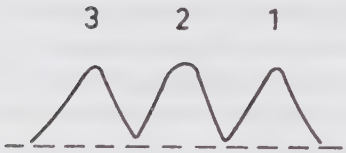


Abb. 6: Remissionsortskurve von Dihydroergotoxin = 1_{γ}

(--) = Remissions-untergrund

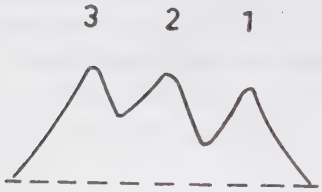


Abb. 7: Remissionsortskurve von Dihydroergotoxin = 2_{γ}

(--) = Remissions-untergrund

2. Remissionsortskurven * aufgenommen bei 560 nm.

Abb. 8: Remissionsortskurve von Dihydroergotoxin = 2_{γ}

(--) = Remissions-untergrund

(↕) = Stufenhöhe

---

* Bezeichnung der einzelnen Alkaloide:

1 = Dihydroergokryptin
2 = Dihydroergocornin
3 = Dihydroergocristin

Die Remissionsortskurven der einzelnen Abbildungen (Abb. 6 u. Abb. 7) des Dihydroergotoxins haben bei der Messung im UV - Bereich (285 nm) annähernd die gleichen Flächen. Der Schreiber des Spektralphotometers erreicht nach der Aufzeichnung der Kurven wieder den Nullwert, so daß Schwanzbildung ausgeschlossen ist; ein Hinweis auch darauf, daß die Zelluloseschicht der Platte gleichmäßig imprägniert worden ist.

Bei der Messung im sichtbaren Bereich (560 nm) verändern sich die Flächenwerte stark zugunsten des Dihydroergocristins (Abb. 8). Der Schreiber erreicht den Remissionsuntergrund nicht wieder. Diese ungleichmäßige Verteilung der Flächen tritt auch bei weniger als 2γ aufgetragenen Gesamtalkaloids auf. Der Remissionsuntergrund täuscht also durch Besprühen mit van Urk - Reagens und anschließender Salzsäurebehandlung für die einzelnen Alkaloide zu hohe Flächenwerte vor. Die folgenden Ergebnisse erhärten diese Vermutung.

Die getrennten Alkaloide wurden bei 285 nm und 560 nm quantitativ bestimmt. Als Eichsubstanz diente Dihydroergocristin. Die Alkaloidkomplexe wurden zu 1γ und zu 2γ aufgetragen. Einen ersten Anhaltspunkt für die Genauigkeit einer Messung bei 285 nm oder 560 nm boten die Eichkurven. Anhand der Eichkurven ließ sich feststellen, ob die errechneten Flächen des Alkaloids auf imprägnierten Platten zuverlässige Eichgeraden ergaben, die von Versuch zu Versuch reproduzierbar waren.

Die Flächenwerte der Eichsubstanz aus zwei Meßreihen bei 285 nm stimmen bis auf die große Differenz für 0,5γ Dihydroergocristin weitgehend überein. Die maximale Abweichung vom Mittelwert beträgt 5 proz. Die Meßreihen wurden auf zwei Platten aufgenommen, die getrennt voneinander imprägniert wurden. Die Eichkurve (Abb. 9) veranschaulicht die Streuung der Werte.

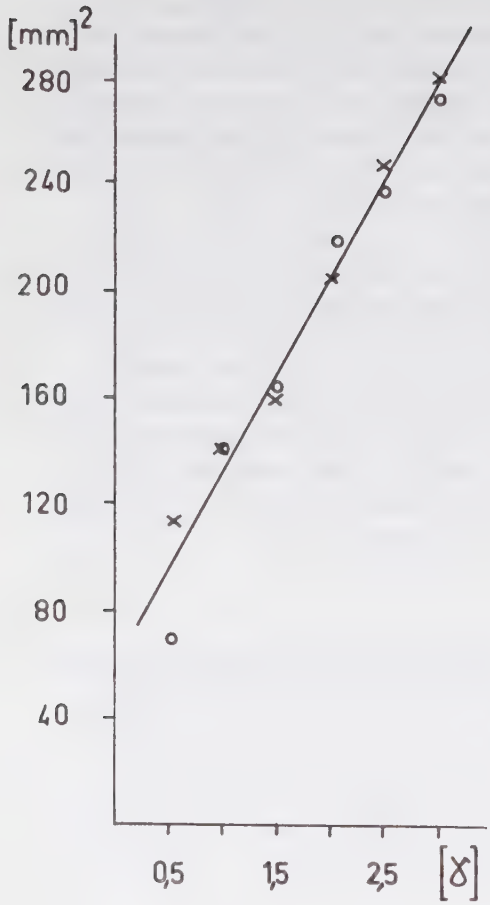


Abb. 9: Eichkurve von Dihydroergocristin bei 285 nm.

(×) = Werte für die erste Meßreihe

(o) = Werte für die zweite Meßreihe

Während für 1γ aufgetragenes Gesamtalkaloid Dihydroergotoxin die Flächenwerte der getrennten Komponenten annähernd gleich sind (44,0 mm^2, 46,7 mm^2 u. 44,0 mm^2), weisen die entsprechenden Werte für 2γ im gleichen Versuch größere Abweichungen voneinander auf. Der höchste Flächenwert liegt 34 proz. über

dem tiefsten (58,7 mm^2, 80,2 mm^2 u. 86,6 mm^2). Die Summe der Flächenwerte, bezogen auf 2γ Gesamtalkaloid, entspricht bei einer Meßreihe ungefähr der aufgetragenen Menge Dihydroergocristin (216,4 mm^2 zu 224,4 mm^2), bei einer anderen liegt sie allerdings um 25 proz. über dem entsprechenden Wert der Eichsubstanz (206,2 mm^2 zu 252,5 mm^2). Die Summe der Einzelflächen für 1γ aufgetragenes Dihydroergotoxin ist bei beiden Meßreihen reproduzierbar. Aus der Eichkurve abgelesen ergibt sich für 1γ aufgetragenes Gesamtalkaloid:

1. Meßreihe 134,7 mm^2 = 0,9γ
2. Meßreihe 146,0 mm^2 = 1,1γ

Die Messungen bei 560 nm wurden ebenfalls auf verschiedenen Platten vorgenommen. Die Streuung der Eichwerte ist sehr groß. Die Differenz beider Meßreihen beträgt durchweg 100 mm^2. Die Eichkurven (Abb. 10) laufen nahezu parallel.

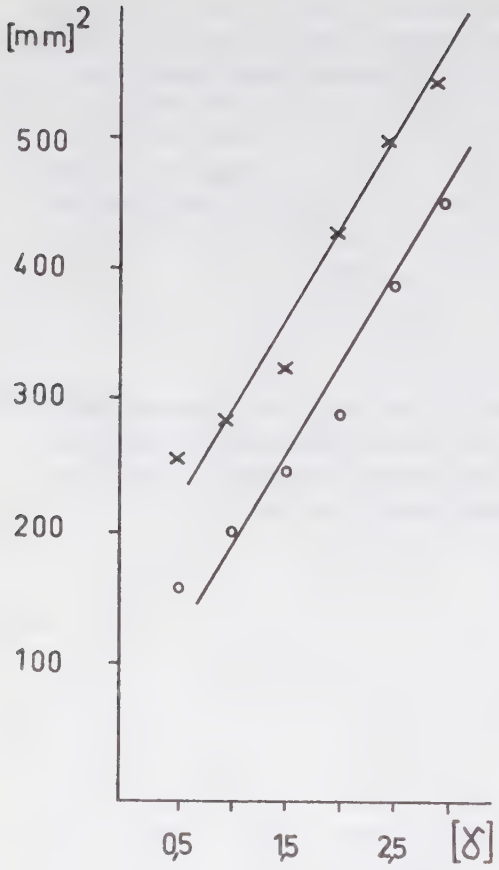


Abb. 10: Eichkurven von Dihydroergocristin bei 560 nm.

(×) = Werte für die dritte Meßreihe

(o) = Werte für die vierte Meßreihe

Die maximale Abweichung der Summe der Flächen getrennter Alkaloidkomponenten aus Dihydroergotoxin beträgt 61 proz. des entsprechenden Wertes für die Eichsubstanz Dihydroergocristin (Flächenwerte für 1_{γ} aufgetragenes Dihydroergotoxin 98,0 mm^2, 172,0 mm^2 u. 220,5 mm^2 = 490,5 mm^2; vergl. Dihydroergocristin für 1_{γ} = 288 mm^2).

Für Dihydroergocristin wird ein zu großer Gehalt vorgetäuscht. Dihydroergokryptin ist nach den gemessenen Flächen nur bis zu ca. 20 proz. im Alkaloidgemisch enthalten.

Die Ungenauigkeit der Gesamtfläche bei 560 nm beider Meßreihen kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß auf den Platten beim Anfärben mit van Urk-Reagens und anschließender Salzsäurebehandlung eine nachträgliche ungleichmäßige Vergrößerung der Flecke entsteht.

Besonders deutlich zeigen die Flächenwerte des Alkaloidgemisches bei 560 nm und bei 285 nm bei 2γ aufgetragenem Dihydroergotoxin, wie stark sich die nicht ideal aufgelösten Kurven durch Überlappung beeinflussen. Das sich stärker absetzende Dihydroergokryptin (größter Rf-Wert) hat immer den kleinsten Flächeninhalt im Verhältnis zu den dichter beieinander liegenden beiden anderen Komponenten Dihydroergocornin und Dihydroergocristin. Bei 560 nm werden nur ca. 50 proz. Dihydroergokryptin (ca. 77 mm^2 Dihydroergokryptin zu 160 mm^2 Dihydroergocornin bzw. Dihydroergocristin) und bei 285 nm 35 proz. weniger Dihydroergokryptin (ca. 51 mm^2 u. 59 mm^2 Dihydroergokryptin zu 82 mm^2 u. 83 mm^2 Dihydroergocornin bzw. Dihydroergocristin) aus den Flächenwerten errechnet.

Für eine möglichst genaue Prozentangabe der Einzelalkaloide im vorliegenden Gemisch ist es notwendig, daß nicht nur ihre Gesamtfläche, sondern die Remissionsortskurven der einzelnen Komponenten denen der entsprechenden Eichwerte gleich sind.

Eine weitere Meßreihe soll daher aus den Erfahrungen der vorhergehenden aufgestellt werden und zeigen, daß es möglich ist, bei 285 nm die Anteile der Alkaloide Dihydroergokryptin, Dihydroergocornin und Dihydroergocristin in Dihydroergotoxin reproduzierbar zu bestimmen.

Man muß mit der aufzutragenden Menge Eichsubstanz soweit heruntergehen, daß gerade noch meßbare Flächen vom Schreiber des Spektralphotometers aufgezeichnet werden (ca. 0,3 γ). Ferner sollte man nicht mehr als 1,6 γ Dihydroergotoxin zur Trennung auftragen. Mit diesen zusätzlichen Erfahrungen ließen sich die bisherigen Ergebnisse bei 285 nm für 1 γ Dihydroergotoxin in weiteren Meßreihen bestätigen.

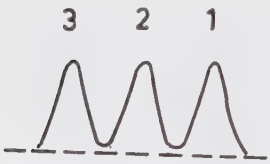


Abb. 11: Remissionsortskurve von Dihydroergotoxin, aufgetragen = 1,6 γ .

(1) = Dihydroergokryptin
(2) = Dihydroergocornin
(3) = Dihydroergocristin
(-) = Remissionsuntergrund

Die Remissionsortskurven der getrennten Alkaloide sind für 1,6 γ aufgetragenes Dihydroergotoxin nebenstehend abgebildet (s. Abb. 11). Der Verlauf der Kurven zeigt deutlich, daß die einzelnen Alkaloide zu annähernd gleichen Teilen im Gemisch enthalten sind.

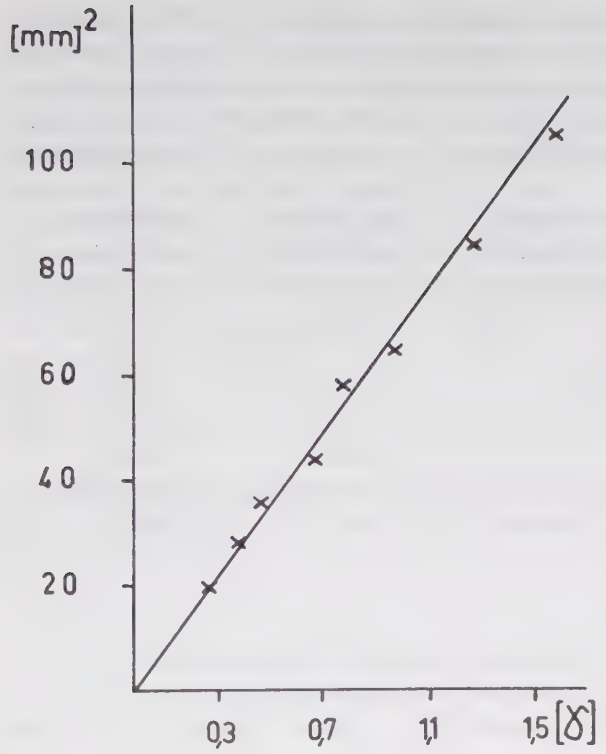


Abb. 12: Eichkurve Dihydroergocristin der 5. Meßreihe bei 285 nm.

Für die einzelnen Flächen der Alkaloidkomponenten wurden über die Eichkurve (s. Abb. 12) folgende γ -Mengen ermittelt:

Dihydroergokryptin:	Fl. 38 mm^2	= 0,56 γ
Dihydroergocornin:	Fl. 40 mm^2	= 0,60 γ
Dihydroergocristin:	Fl. 41 mm^2	= 0,61 γ
		1,77 γ

Entsprechend der Gesamtfläche von Dihydroergotoxin (119 mm^2) macht das einen Zuwachs von 10 proz. bei der praktischen Durchführung gegenüber den Bezugsgrößen der Eichsubstanz aus.

In einer abschließenden Übersicht werden über die Flächenwerte die Anteile der Alkaloidkomponenten im Gemisch Dihydroergotoxin in Prozent aufgezeichnet. Diese Werte werden mit den Angaben für die Probe verglichen, die für diese Bestimmung zur Verfügung stand. Die Tabelle zeigt die recht gute Übereinstimmung.

	Dihydroergo-kryptin %	Dihydroergo-cornin %	Dihydroergo-cristin %
1. Meßreihe*	32,6	34,8	32,6
2. Meßreihe*	31,5	35,0	33,5
3. Meßreihe	31,2	34,3	34,5
Mittelwert:	31,8	34,7	33,5
Deklaration des untersuchten Präparates**:	32,3	32,3	35,4

Es erhebt sich die Frage, inwieweit sich die einzelnen Remissionsortskurven der Alkaloidkomponenten durch Erhöhung einer Komponente z. B. Dihydroergocristin verändern. Dabei läßt sich feststellen, daß durch Überlappung bei noch mäßiger Auflösung der

---

* Die Prozentangaben der ersten und zweiten Meßreihe wurden über die Flächen der Alkaloidkomponenten für 1 γ aufgetragenes Dihydroergotoxin berechnet.

** Fa. Dr. R. Pfleger, Bamberg.

Trennung für 1,6γ Gesamtalkaloid durch Zugabe von 0,2γ Dihydroergocristin (12,5 %) die Remissionsortskurven von Dihydroergokryptin und Dihydroergocornin erhalten bleiben. Bei Zugabe von 0,4γ (25 %) bzw. 0,6γ (37,5 %) Dihydroergocristin nehmen die Flächen für Dihydroergokryptin um ca. 30 proz. und Dihydroergocornin um mehr als 50 proz. ab (dies zeigten 2 Meßreihen). Es ist daher bei einer genauen quantitativen Untersuchung mit Hilfe der Spektralphotometrie auf imprägnierten Zelluloseplatten notwendig, daß ein Alkaloidgemisch vorliegt, in dem annähernd gleiche Anteile der einzelnen Komponenten enthalten sind.

Als Schlußfolgerung aus allen Messungen ergibt sich:

Für die UV-Messung ist eine Reproduzierbarkeit für weniger als 2γ aufgetragenen Dihydroergotoxins gegeben, wenn die Komponenten annähernd zu gleichen Teilen im Gemisch enthalten sind.

Grundsätzlich problematisch sind kleinflächige Kurven, bei denen mit großen Blenden (bis 0,8) gearbeitet werden muß. Ferner stört das Imprägnierungsmittel Formamid, das die Intensität der Fluoreszenzlöschung stark abschwächt.

Die Auswertung mit Hilfe der van Urk-Reaktion bei chromatographisch trennbaren Mengen Gesamtalkaloid ohne Schwanzbildung (1-2γ) auf imprägnierten Platten ist schlecht reproduzierbar. Obgleich die Substanzen klar getrennt sind, werden die Alkaloide zu ungleich angefärbt.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung eines Alkaloidgemisches und seiner Einzelkomponenten ist der Weg über die Trennung der natürlichen, ungesättigten Alkaloidgruppe Ergotoxin[9)], die Bestimmung der Einzelkomponenten und anschließende Hydrierung, denn das Alkaloidgemisch wird vollständig in ◁ 9 - 10 hydriert *.

---

9) J. Chemistry 44, 631 (1969)

* Eigene Versuche nach Helv. Chim. Acta 26, 2070 (1943)

UV-Spektren der Lösungen von Dihydroergocristin und Ergocristin.

Als Ergänzung zur chromatographischen Trennung Δ 9 - 10 hydrierter Alkaloide des Ergotoxinkomplexes von den entsprechend ungesättigten, natürlichen Verbindungen wird eine UV-Absorptionsmethode beschrieben, mit der es möglich ist, beide Verbindungsgruppen zusammen in Lösung quantitativ zu erfassen.

Bei dieser Bestimmung geht man von den UV-Spektren des Lysergsäurealkaloids (Ergocristin), sowie seines Dihydroderivates (Dihydroergocristin) aus.

Zunächst wurden die Absorptionskurven einer Lösung von 9 mg Dihydroergocristin und von 9 mg Ergocristin in Methanol aufgezeichnet (Abb. 13).

Beim Maximum des Ergocristins (312 nm) absorbiert das Δ 9 - 10 hydrierte Derivat nicht, während bei 281 nm, dem Maximum des Dihydroergocristins, die Extinktion des Ergocristins 0,5 beträgt.

Mischungen beider Alkaloide aus den Ausgangslösungen ergeben charakteristische Kurven (Abb. 13).

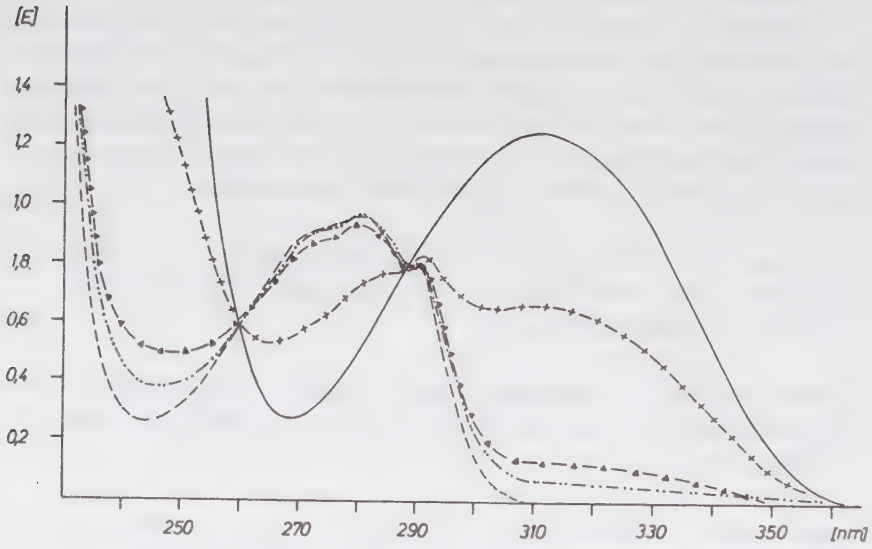


Abb. 13: UV-Absorptionsspektren der Alkaloide Dihydroergocristin und Ergocristin und ihrer Mischungen.

Dihydroergocristin (----) 9 mg / 100 ml Methanol
Ergocristin (——) 9 mg / 100 ml Methanol

Dihydroergocristin / Ergocristin 50 : 50 (-+-)
Dihydroergocristin / Ergocristin 90 : 10 (-▲-)
Dihydroergocristin / Ergocristin 96 : 4 (-·-·-)

Liegen Dihydroergocristin und Ergocristin zu gleichen Teilen in der Lösung vor, so fällt das Maximum ihrer Kurve mit dem Nebenmaximum der Absorptionskurve des Dihydroergocristins zusammen.

Mischung: Maximum 292 - 93 nm (0,84)
Dihydroergocristin: Nebenmaximum 292 nm (0,81)

Bei steigendem Dihydroergocristin-Gehalt verflacht das Nebenmaximum,und die resultierende Absorptionskurve gleicht sich dem Verlauf der Dihydroergocristin-Absorption immer mehr an.

Durch Vergleich mit den charakteristischen Absorptionskurven des Dihydroergocristins und Ergocristins kann eine unbekannte Probe also daraufhin untersucht werden, ob ein natürlich ungesättigtes, ein Δ 9 - 10 hydriertes Alkaloid oder eine Mischung beider vorliegt.

Mit dieser Methode ist es auch möglich, beide Komponenten nebeneinander in einer Lösung quantitativ zu bestimmen.

In einem Diagramm (Abb. 14) sind die Extinktionen gegen die prozentualen Anteile jedes Alkaloids in der Mischung von beiden aufgetragen. Gemessen wird jeweils die Extinktion bei 281 nm und 314 nm. Die eingetragenen Werte für 100 proz. sind die gemessenen Extinktionen der Maxima von Dihydroergocristin und Ergocristin.

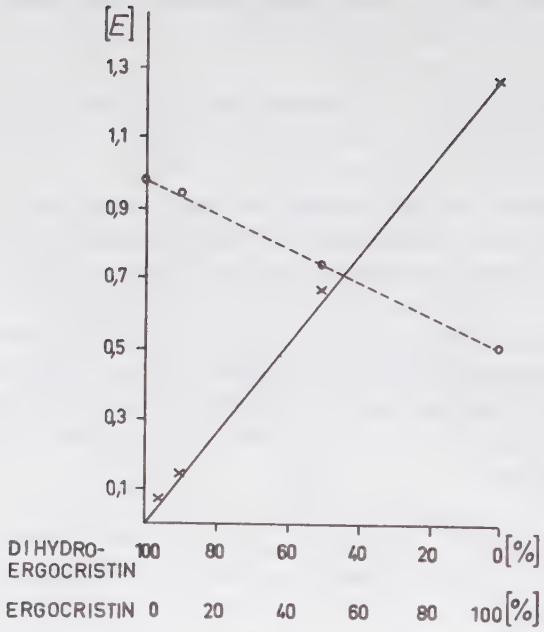


Abb. 14: Diagramm zur Bestimmung der Anteile einer Mischung von
Dihydroergocristin
((---) = Extinktionen gemessen bei 281 nm)
und Ergocristin
((——) = Extinktionen gemessen bei 312 nm)

Alle dazwischen liegenden Punkte stellen Extinktionen der Mischungen dar. Für beide Substanzen resultieren Geraden. Die positive Richtung der Abszisse im Diagramm (Abb. 14) weist auf einen prozentual steigenden Anteil des Ergocristins im Gemisch hin, während in ihrer negativen Richtung der Anteil an Dihydroergocristin zunimmt. Da beim Maximum des Ergocristins für Dihydroergocristin keine Extinktion gemessen wird (s. Abb. 13 bei 312 nm), läuft die durchgezogen gezeichnete Gerade im Diagramm (s. Abb. 14) durch den Nullpunkt, während die gestrichelte Gerade bis zu der Extinktion abfällt, die für Ergocristin bei 281 nm (= Nanometerwert des Maximums für Dihydroergocristin) gemessen wird.

Wird bei 281 nm eine Extinktion von 0,95 (gestrichelte Gerade, Abb. 14) gemessen, so enthält das Gemisch 90 proz. Dihydroergocristin. Entsprechend dem Diagramm muß die Extinktion für 10 proz. Ergocristin bei 314 nm 0,14 (durchgezogene Gerade, Abb. 14) betragen. Werden bei 281 nm und 314 nm gleiche Extinktionen gemessen (Schnittpunkt beider Geraden), so liegen beide Alkaloide zu etwa gleichen Anteilen in der Lösung vor.

Mit diesem System läßt sich quantitativ bestimmen, wie stark eine unbekannte Probe eines Dihydroergotoxinalkaloids mit einer natürlichen, ungesättigten Komponente und eine Probe des Ergotoxinkomplexes mit einem hydrierten Derivat verunreinigt ist.

Literaturangaben über die Stabilität von Mutterkornalkaloiden und eigene Stabilitätsuntersuchungen.

Auf eine gesteigerte Stabilität der Dihydroderivate gegenüber ihren natürlichen Stammverbindungen gegen Licht und oxidierende Einflüsse, sowie Säuren und Alkali wiesen A. Stoll und A. Hofmann hin [10].

Nach langwierigen Lagerungsversuchen (10 Jahre) [11] wurden Lösungen von Dihydroergotamin und Dihydroergotoxin als methansulfonsaure Salze papierchromatographisch getrennt. Nach den damaligen Methoden stellte man nach dieser Zeit noch 90 proz. unveränderten Wirkstoff fest. Als wichtigstes Spaltprodukt wurde das Amid sowie die durch Isomerisierung im Peptidteil bei schwach saurer Lösung entstehende Aciform identifiziert. Eine Isomerisierung am C - 8 wurde ausgeschlossen.

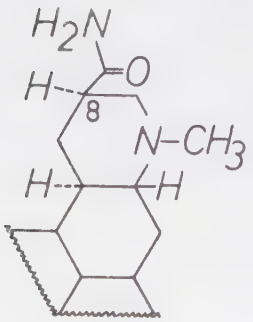
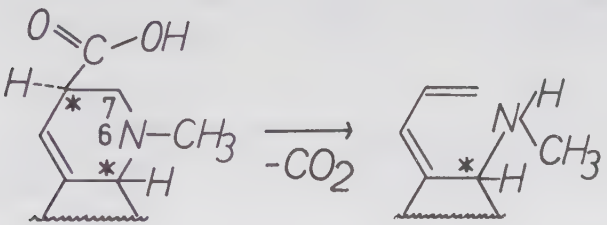


Abb. 15:
Strukturformel von Dihydrolysergsäureamid.

---

10) Helv. chim. Acta 26, 2070 (1943)
11) Pharmac. Acta Helvetiae 36, 473 (1961)

Der Ring D der Lysergsäure ließ sich beim Erhitzen im Dowtherm * (Sdp. 251 °) [12] zwischen N - 6 und C - 7 spalten.



Spaltung des Ringes D der natürlichen Lysergsäure durch Erhitzen im Dowtherm.

Unter CO_2-Abspaltung bildet sich eine zum vorhandenen System konjugierte Doppelbindung aus.

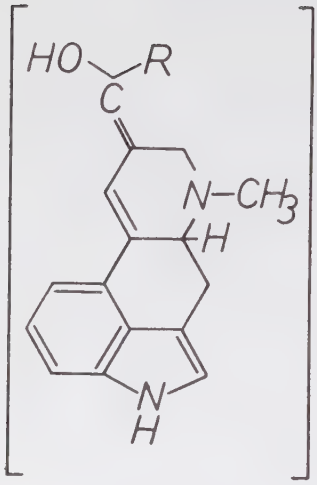
Aufgrund der Möglichkeit zur Bildung konjugierter Doppelbindungen der natürlichen, ungesättigten Verbindungen im Ring D, wurde auf deren leichte Isomerisierbarkeit über die Enolform geschlossen. Diese Isomerisierbarkeit ist bei den Δ 9 - 10 gesättigten Verbindungen erschwert, weil sich kein konjugiertes System ausbilden kann. Außerdem kann mit stark sauren Reagenzien aus dem Indolsystem einer ungesättigten Verbindung ein Indolinsystem [13] entstehen. Diese Produkte sind sehr luftempfindlich.

---

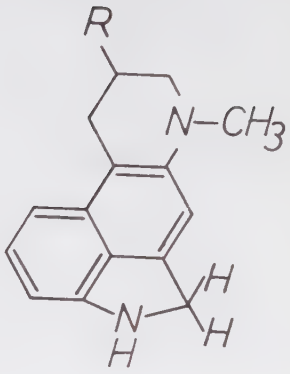
* Apparatur zur Pyrolyse

12) A. Hofmann, Die Mutterkornalkaloide, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1964), S. 43.

13) Helv. chim. Acta 36, 1125 (1953)



Enolform der Lysergsäure



Indolinderivat

Die eigenen Stabilitätsuntersuchungen hydrierter Mutterkornalkaloide, insbesondere des Dihydroergocristins und des Dihydroergotoxinmethansulfonats, befassen sich nicht mit jahrelanger Lagerung unter bestimmten klimatischen Bedingungen, sondern die Alkaloide wurden kurzzeitig extremen Bedingungen ausgesetzt, wie dem Sonnenlicht, der UV-Bestrahlung bei 254 nm und der Hitze von 100 °.

Über die unter extremen Bedingungen möglicherweise entstehenden Spalt- und Isomerisierungsprodukte ließe sich dann auf die Stabilität bei normalen Verhältnissen schließen. Eine Möglichkeit zur Umrechnung bieten Stabilitätskarten [14].

Zur Untersuchung der Haltbarkeit unter extremen Bedingungen standen folgende Alkaloide bzw. deren Lösungen zur Verfügung: Ergocristin (kristallin), Dihydroergocristin (kirstallin), Dihydroergotaminmethansulfonat (kristallin), Dihydroergotoxinmethansulfonat (kristallin) und Hydergin^{R*}-Ampullen.

Für die freien Basen Ergocristin und Dihydroergocristin wurde Methanol, für die Alkaloidsalze Wasser als Lösungsmittel verwendet.

Die eigentliche Untersuchung über die Stabilität beschäftigt sich vorrangig mit den Δ 9 - 10 hydrierten Verbindungen. Verglichen wurde mit Ergocristin, einem in der Literatur als instabil beschriebenen Vertreter der natürlichen, ungesättigten Alkaloide. Außerdem wäre es möglich, daß Dihydroergocristin und

---

14) Pharmac. Acta Helvetiae 42, 301 (1967)

* Fa. Sandoz, Nürnberg

Ergocristin unter gleichen Bedingungen im selben Lösungsmittel aufgrund ihres sich entsprechenden Peptidteils ähnliche Zersetzungsprodukte liefern könnten.

Als Vergleichslösung der wässrigen Lösung des Dihydroergotoxinmethansulfonats dienten Hydergin^{R}-Ampullen, deren Stammlösung mit Wasser auf den gleichen Gehalt eingestellt wurde. Die Probe Dihydroergotoxinmethansulfonat war prozentual in etwa gleich zusammengesetzt bezüglich der Alkaloidkomponenten Dihydroergocristin, Dihydroergokryptin und Dihydroergocornin wie der Alkaloidkomplex im Hydergin^{R}.

Die Überprüfung mit verschiedenen Fließmitteln auf Dünnschichtplatten ergab für den Hydergin^{R}-Wirkstoff und dem zur Verfügung stehenden Dihydroergotoxinmethansulfonat gleiche Rf-Werte. Ein UV-Absorptionsspektrum beider Produkte gleicher Konzentration zeigt einen identischen Verlauf der Kurven mit dem Hauptmaximum von 280 nm.

Verfärbungen einiger Alkaloid-lösungen unter äußeren Einflüssen.

Die dem Sonnenlicht ausgesetzten oder auf 100 ^{o} erhitzten methanolischen und wässrigen Lösungen der Δ 9 - 10 hydrierten Verbindungen und des Ergocristins färben sich besonders im Licht nach wenigen Stunden gelb bis braun. Am empfindlichsten reagiert der Färbung nach Ergocristin. Nach einer Stunde Lichteinwirkung waren Ergocristin-Lösungen auch bei geringen Konzentrationen (4,5 mg / 100 ml) gegenüber zehn- und fünfzigfacher Konzentration gelb.

Je konzentrierter die Lösungen waren, desto eindeutiger konnte der entstehende Farbton nach der Sonnenlichtbestrahlung beschrieben werden. Nach einer bestimmten Zeit wurden einige Lösungen trübe, und es entstand ein flockiger Niederschlag (Dihydroergotoxinmethansulfonat wässrig, 96 h Licht). Eine bei Sonnenlichteinwirkung stark verdünnte, methanolische Lösung des Dihydroergocristins (4,5 mg / 100 ml) erschien nach 24 h farblos; die um das zehnfache stärkere Lösung war bereits nach 48 h hellgelb, während die konzentrierte Lösung (200 mg / 100 ml) nach 48 h bereits gelb - grün gefärbt war. Nach gleichen Zeiten waren die methanolischen Lösungen des Ergocristins bereits gelb bzw. braun - grün gefärbt.

Bei der späteren, chromatographischen Überprüfung wurden die gelben bis braunen Gemische möglichst am Start gehalten. IR-Spektren dieser Substanzen gaben keine charakteristischen Banden. Es handelt sich wahrscheinlich um Polymerisationsprodukte, die sich aufgrund der Doppelbindungen des Indolsystems bilden könnten; möglicherweise treten auch chinoide Formen auf.

Ergocristin verfärbt sich nach dem Erhitzen am stärksten, die methanolischen Lösungen (30 mg / 100 ml) wurden grün; stärkere Verfärbungen traten auch nach längerer Behandlung nicht auf. Die Δ 9 - 10 hydrierten Alkaloide verfärbten sich nicht so stark nach dem Erhitzen. Während besonders die methanolischen Lösungen der hydrierten Alkaloide nach 96 h noch gelb waren, nahmen die mit Licht bestrahlten Lösungen hellbraune Farbe an. Die wässrigen Lösungen der Salze wurden dagegen im Sonnenlicht grün mit flockigem Niederschlag und beim Erhitzen braun - grün.

Aus derartigen Verfärbungen verschiedener Intensität ließen sich keine präzisen Angaben über das Maß der Zersetzungen machen. Es könnten Spaltungsreaktionen, Umlagerungsreaktionen im Peptidteil (Aciumlagerung) oder möglicherweise auch Isomerisierungen am C - 8 eintreten.

Die Farbentwicklung lief von hellgelb nach gelb bis braun, bis sie schließlich dunkelgrün wurde und ein flockiger Niederschlag entstand (Ergocristin). Allgemein verfärben sich die wässrigen Lösungen der Salze stärker als die methanolischen Lösungen der Basen. Dies liegt, besonders nach dem Erhitzen, nicht nur am Lösungsmittel, sondern auch am pH-Wert der Lösung. Die Lösung des Dihydroergotoxinmethansulfonats in Wasser hat einen pH-Wert von 6.

Die Farbentwicklung nach 96 h ist am intensivsten beim Ergocristin, sowohl in der Wärme als auch im Licht. Der Farbintensität nach ist die methanolische Lösung des Dihydroergocristins gegen Sonnenlicht empfindlicher als gegenüber dem Erhitzen (Sonne - hellbraun, Hitze - hellgelb).

Auch die wässrigen Lösungen des Dihydroergotoxinmethansulfonats verhielten sich entsprechend (Sonne - grün, Niederschlag; Hitze-braun - gelb).

Die mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlten Alkaloidlösungen in Quarzglasbehältnissen zeigten nach 96 h eine gelb - grüne Färbung. Die methanolische Lösung des Dihydroergocristins und die wässrige Lösung des Dihydroergotoxinmethansulfonats fluoreszierten nach 48 h gelb - grün. Die Eigenfluoreszenz des Ergocristins wurde nach 48 h durch die intensive braun - grüne Färbung der Lösung überdeckt.

Auffallend war die entstehende gelb - grüne Fluoreszenz (450 - 550 nm), die bei den hydrierten Alkaloiden in methanolischer und wässriger Lösung auftrat.

Dünnschichtchromatographie der durch Licht- bzw. Hitzeeinwirkung entstandenen Alkaloidgemische.

Die dem Licht ausgesetzten oder erhitzten Lösungen wurden mit verschiedenen Fließmitteln chromatographiert. Dabei sollten die Zersetzungsprodukte möglichst klar abgetrennt werden, die gelben Farbflecke am Start gehalten und sich das unzersetzt bleibende Alkaloid klar absetzen.

Anschließend wurden die Platten (Kieselgel F_{254}, Merck) mit van Urk-Reagens besprüht.

Eine gute Trennung der sonnenbestrahlten Produkte wurde mit folgender Fließmittelkombination erreicht: Chloroform 90, Äthanol 10 und n-Heptan 5, bei einer Laufhöhe von 10 - 13 cm; Detektion: Fluoreszenzlöschung F_{254} und van Urk.

Für die erhitzten Produkte eignet sich folgendes Fließmittel: Diäthylamin 50 und n-Heptan 40, bei einer Laufhöhe von 10 cm; Detektion: Fluoreszenzlöschung F_{254} und van Urk.

Beim zweiten Fließmittelgemisch waren die Flecke unscharf. Es war deshalb günstiger, für ihre quantitative Bestimmung mit Hilfe der Spektralphotometrie (wird später beschrieben) n-Heptan durch Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff zu ersetzen (Diäthylamin 50, Chloroform 50).

Die Bestimmung möglicher Hydrolyse-Produkte der Peptidalkaloide, nämlich der Dihydrolysergsäure und des Dihydrolysergsäureamids nebeneinander, ist auf Kieselgel mit Methanol 50 und Essigsäureäthylester 50 möglich (Abb. 15).

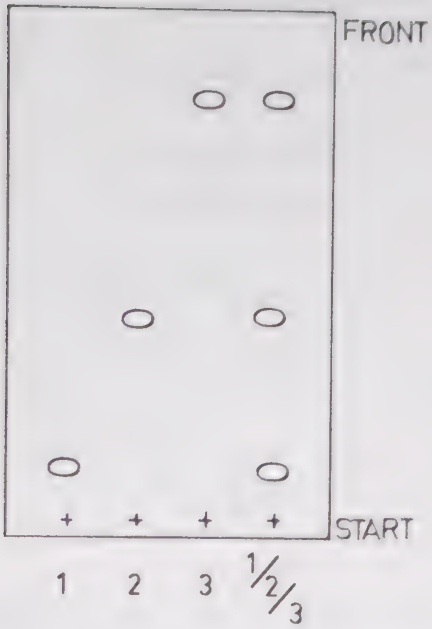
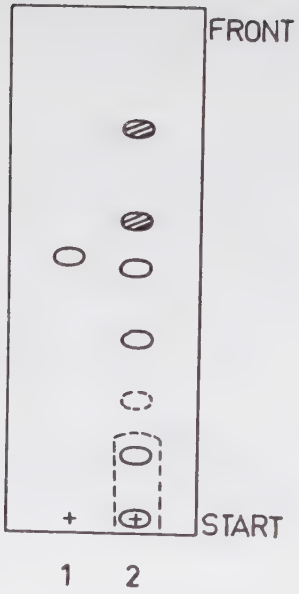


Abb. 15: Trennung der hydrolysierten Anteile vom Peptidalkaloid.

1 = Dihydrolysergsäure
2 = Dihydrolysergsäureamid
3 = Dihydroergocristin

Abb. 16 zeigt als Beispiel für chromatographische Trennungen der durch Sonnenlichtbestrahlung entstandenen Gemische aus X des behandelten Dihydroergocristins.



Sichtbar durch:

Fluoreszenzlöschung

Fluoreszenzlöschung

van Urk-Reagens positiv

van Urk-Reagens positiv

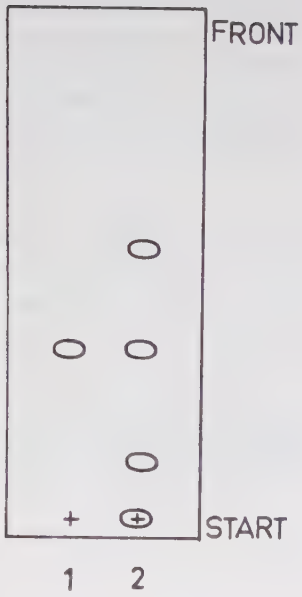
gelb

gelb

gelb

Abb. 16: Dihydroergocristin, methanolische Lösung, Licht zersetzt. Laufhöhe 11,5 cm.
1 = Dihydroergocristin
2 = Zersetzungsprodukte nach Sonnenbestrahlung

Nur noch zwei Flecke ergeben nach der Sonnenbestrahlung eine positive van Urk-Reaktion (Abb. 16). Nach dem Rf-Wert des reinen Alkaloids handelt es sich dabei um erhaltenes Restalkaloid, sowie mit kleinerem Rf-Wert um ein Spaltprodukt. Die gestrichelt gezeichneten Flecke sind gelb gefärbt und die über das Alkaloid hinausgelaufenen schraffiert gezeichneten Flecke nur durch Fluoreszenzlöschung sichtbar.



Im Gegensatz dazu zeigen alle nach dem Erhitzen auftretenden Zersetzungsflecke eine positive van Urk-Reaktion (Abb. 17).

Abb. 17: Dihydroergocristin, erhitzt, alle Zersetzungsprodukte mit van Urk-Reagens positiv.

1 = Dihydroergocristin
2 = Erhitztes Alkaloid mit Zersetzungsprodukten

Nach dem Erhitzen der methanolischen Lösung des Dihydroergocristins auf 100 ^{o} bilden sich neben dem Restalkaloid drei Zersetzungsflecke.

Methanolische Lösungen der freien Base Dihydroergocristin ergaben nach längerer Sonnenlichteinwirkung, auch bei konzentriertem Auftragen auf die Platte, keine positive van Urk-Reaktion mehr; d. h. also, daß die α-Indolstelle des Alkaloids substituiert sein muß. Dieser Versuch wurde mehrere Male wiederholt und brachte stets das gleiche Ergebnis. Nach vergleichbar intensivem Erhitzen reagierten die Zersetzungsflecke auf der Platte mit dem van Urk-Reagens positiv.

Die Chromatogramme zeigen deutlich, daß Hitze oder Sonnenlichteinwirkung die Alkaloide stark zersetzen und daß die Zersetzungsprodukte verschieden sind.

UV-Absorptionsspektren zersetzter Alkaloidlösungen.

Für die Aufnahme von UV-Absorptionsspektren eignet sich erfahrungsgemäß eine Konzentration des Alkaloids von 4,5 mg in 100 ml Lösungsmittel. Diese Lösungen zeigen bei den oben beschriebenen Stabilitätsuntersuchungen die geringsten Verfärbungen, so daß die UV-Spektren gut auswertbar sind.

Gemessen wurden die Lösungen der freien Basen Ergocristin und Dihydroergocristin in Methanol, die Alkaloidsalze Dihydroergotoxinmethansulfonat und Hydergin^{R} in Wasser nach 96 h Sonnen- bzw. UV-Lichtbehandlung oder ebenso langem Erhitzen auf 100 °.

Das Hauptmaximum bei 312 nm und das Minimum bei 270 nm des natürlichen Alkaloids Ergocristin tritt nach der Behandlung mit Licht nicht mehr auf (Abb. 18).

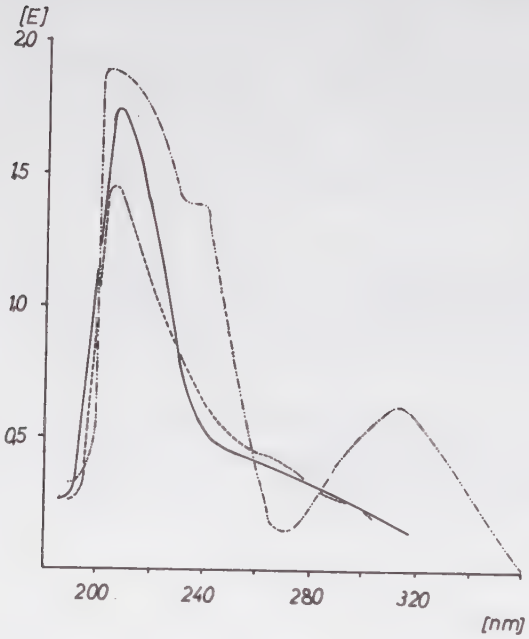


Abb. 18: UV-Absorptionsspektren behandelter methanolischer Lösungen von Ergocristin (reinst) = (—·—·—); Ergocristin nach 96 h UV-Licht 254 nm = (——); Ergocristin nach 96 h Sonnenlicht = (- - - -).

Die Verschiebung der UV-Maxima ist beim erhitzten Ergocristin nicht so groß und die Minima sind weniger ausgeprägt (Abb. 19). Während sich das Minimum der behandelten Lösung in den langwelligeren Bereich verschiebt, bildet sich aus der Schulter des reinen Produktes bei 240 nm ein zusätzliches Nebenmaximum bei 245 nm aus.

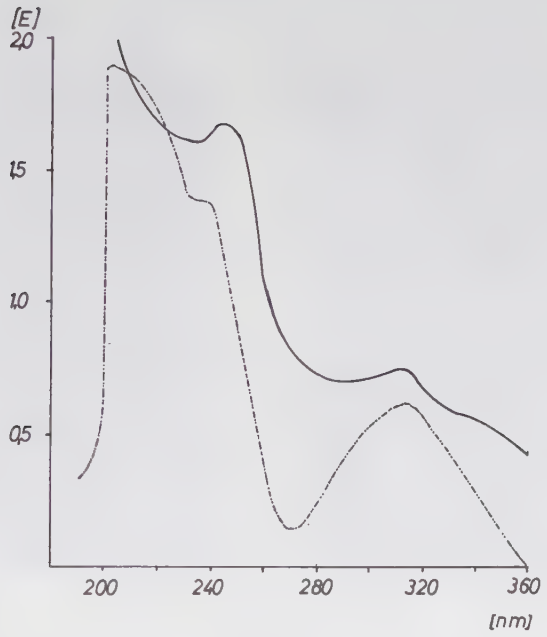


Abb. 19: UV-Absorptionsspektren methanolischer Lösungen von Ergocristin (reinst) = (—··—); Ergocristin nach 96 h Erhitzen auf 100 ^{o} = (——).

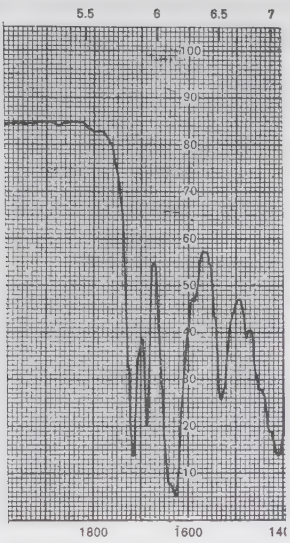
Sowohl nach Behandlung im Licht als auch nach dem Erhitzen sind die Lösungen trotz starker Verdünnung hellbraun bzw. hellgrün gefärbt. Derartige Lösungen können viele Abwandlungsprodukte der Stammverbindungen enthalten und damit auch verschiedene Chromophore. Die Verschiebung der Maxima entspricht aber nicht

neu entstandenen olefinischen Bindungen. Vergleicht man die UV-Absorptionskurven des mit Licht bestrahlten (Abb. 18) und des erhitzten Ergocristins (Abb. 19), so ist das Minimum der UV-Kurve des erhitzten Produktes entsprechend der Zersetzung verflacht, aber im Gegensatz zu dem mit Licht bestrahlten Alkaloid noch erkennbar.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß sich das Ergocristin im Licht sehr schnell zersetzt, aber auch in der Hitze nicht haltbar ist.

Auch IR-Spektroskopisch läßt sich die beim Erhitzen erfolgte Zersetzungsreaktion erkennen. Im Bereich von 1500 - 1900 cm^{-1} liegen die Lacton- bzw. Lactambanden des Peptidringes. Beim reinen Produkt (Abb. 20) kann man scharfe Banden der Lacton-Lactamnatur der Verbindungen zuordnen, während im IR-Spektrum des erhitzten Produktes (Abb. 21) nur eine breite Bande entsteht.

Wavelength in Microns



Wellenlänge

Abb. 20: IR-Spektrum Ergocristin (reinst), Lacton- Lactampeaks.

Abb. 21: IR-Spektrum Ergocristin, Temp. 100 °, 96 h, Rückstand aus gelber methanolischer Lösung.

Ähnliche Untersuchungen an der Dihydroergotoxingruppe sollen zeigen, wie stabil diese im Vergleich zum natürlichen Ergocristin ist.

Das Hauptmaximum der reinen Lösung des hydrierten Alkaloids Dihydroergocristin in Methanol bei 280 nm verschiebt sich nach der Bestrahlung mit Sonnenlicht um 10 nm nach 270 nm. Das Maximum der entsprechenden UV-behandelten Lösung ist von 280 nm um

20 nm nach 260 nm in den hypsochromen Bereich verschoben. In beiden behandelten Lösungen sind die Minima in den langwelligeren Bereich verschoben (Abb. 22).

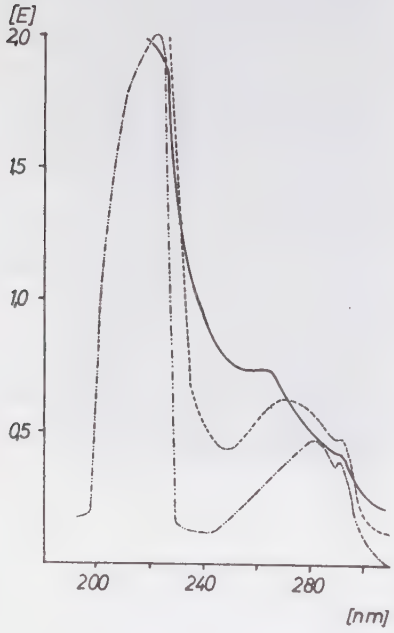


Abb. 22: UV-Spektren behandelter methanolischer Lösungen von Dihydroergocristin (reinst) (—·—·—), Dihydroergocristin nach 96 h Sonnenlichtbestrahlung (- - - -) und Dihydroergocristin nach 96 h UV-Licht (———).

Die gelb-grüne Fluoreszenz bei 254 nm der durch Licht zersetzten Lösungen des Dihydroergocristins, die unzersetzt keine Fluoreszenz zeigen, könnte durch zusätzlich entstandene Doppelbindungen bewirkt werden. Beide Veränderungen, die negative van Urk-Reaktion und die Fluoreszenz bei 254 nm, schließen einander nicht aus. Sie weisen darauf hin, daß ein Gemisch von Produkten entstanden sein kann.

Nach dem Erhitzen der methanolischen Lösungen des Dihydroergocristins zeigen die UV-Absorptionskurven keine Veränderungen gegenüber denen der reinen Produkte. Die van Urk-Reaktion bleibt positiv. Der Chromophor ist erhalten geblieben und die α-Stelle des Indolsystems nicht substituiert worden. Diese Ergebnisse schließen aber eine Isomerisierung nicht aus. Trotzdem ist es möglich, daß eine Veränderung durch Substitution bei einem so geringen Teil des Alkaloids stattgefunden hat, daß sich dies bei der Farbreaktion nicht auswirkt. Die violett-blaue Farbreaktion des 4-Dimethylaminobenzaldehyds mit α-unsubstituierten Indolen gibt aber nur einen Hinweis auf einen unveränderten Chromophor des Alkaloids.

Die methansulfonsauren Salze des Dihydroergotoxins, wie sie auch im Hydergin^{R} enthalten sind, wurden bei gleichen Konzentrationen (4,5 mg / 100 ml, pH 6*) den selben Bedingungen unterworfen. Die UV-Spektren wurden nach 96 h Sonnenlichteinwirkung oder Erhitzen auf 100 ^{o} aufgenommen.

Da sich die Hauptmaxima bei 280 nm und die Minima bei 245 nm bei Dihydroergocristin, Dihydroergokryptin, Dihydroergocornin und Dihydroergotoxin decken, kann die Verschiebung der Spektren der methansulfonsauren Salze in wässriger Lösung als charakteristisch auch für die Salze der Einzelkomponenten unter gleichen Bedingungen angesehen werden.

Stärker als beim Dihydroergocristin in Methanol überlagern sich Maxima und Minima wässriger Lösungen des Dihydroergotoxinmethansulfonats und des Hydergins^{R}, so daß sie um 15 nm von 280 nm nach 265 nm verschoben werden (Abb. 23 u. Abb. 24). Die van

---

* Der Inhalt der Hydergin^{R}-Ampullen wurde mit Wasser auf den gewünschten Gehalt eingestellt.

Urk-Reaktion ist negativ. Trotz der intensiven Belichtung liegen die Werte für die Wellenlängen und Extinktionen beider UV-Kurven dicht beieinander (Tab. 1). Beide Lösungen sind also gegen Sonnenlicht ähnlich stabil.

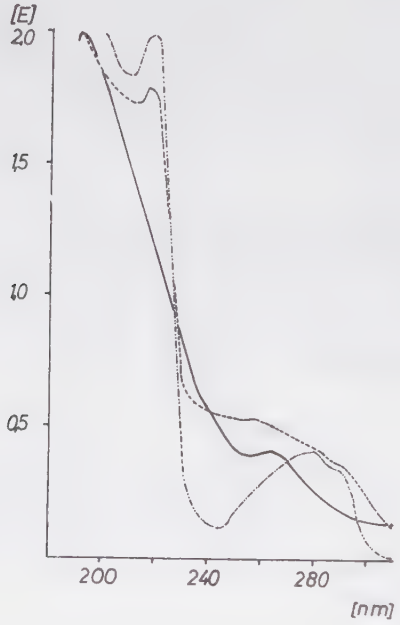


Abb. 23: UV-Absorptionsspektren wässriger Lösungen von Dihydroergotoxinmethansulfonat (reinst) (—··—), Dihydroergotoxinmethansulfonat nach Sonnenbestrahlung von 96 h (———) und Dihydroergotoxinmethansulfonat nach dem Erhitzen auf 100 °, 96 h (- - - -).

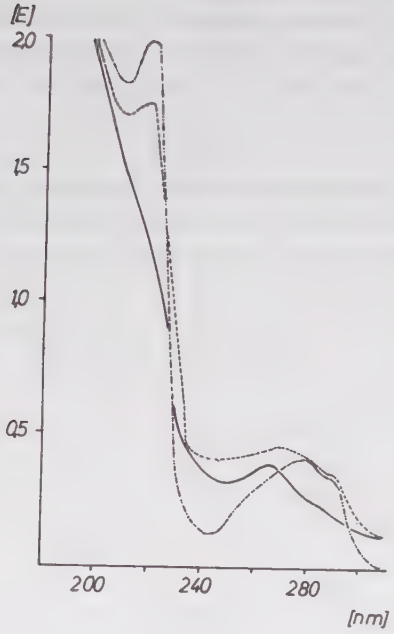


Abb. 24: UV-Absorptionsspektren von Hydergin^{R}-Ampullenlösung unbehandelt (—··—), Hydergin^{R}-Ampullenlösung nach Sonnenbestrahlung von 96 h (———) und Hydergin^{R}-Ampullenlösung nach dem Erhitzen auf 100 °, 96 h (----).

Hitze verschmiert die Maxima und Minima der Alkaloidsalze in wässriger Lösung derart, daß beim Dihydroergotoxinmethansulfonat kein und beim Hydergin^{R} noch ein stark verflachtes Maximum bei 270 nm zu erkennen ist (Abb. 23 u. Abb. 24). Größere Extinktionen rein wässriger Lösungen der Dihydroergotoxinmethansulfonat-

Probe lassen eine weitgehendere Zersetzung nach dem Erhitzen vermuten als die mit Wasser verdünnten Lösungen des Hydergins^{R}. Der Zerfall ist aber ähnlich, denn auf dem Chromatogramm (Abb. 25) treten die selben Flecke auf, die eine positive van Urk-Reaktion geben.

Verglichen mit dem Dihydroergocristin unter gleichen Bedingungen geht eine stärkere oder schwächere Zersetzung mit einer entsprechenden Verschiebung im UV-Spektrum parallel (Tab. 1).

Zusammenfassend werden die Hauptmaxima der reinen Alkaloide und der behandelten Produkte in einer Tabelle (Tab. 1) gegenüber gestellt.

Stoffbez.	Reine Substanz	nach 96 h Sonnenlicht	nach 96 h Erhitzen auf 100 ^{o}
Dihydroergocristin	280 nm (0,48)	270 nm (0,63)	280 nm (0,57)
Ergocristin	310 nm (0,62)	--- ---	310 nm (0,75)
Dihydroergotoxinmethansulfonat	280 nm (0,41)	265 nm (0,42)	255 nm (0,54)
Hydergin^{R} (Ampullen)	280 nm (0,41)	265 nm (0,40)	270 nm (0,46)

Tab. 1: Hauptmaxima mit Wellenlängen und Extinktionen reiner und behandelter Alkaloide;

Konzentrationen: Basen 4,5 mg / 100 ml Methanol
Salze 4,5 mg / 100 ml Wasser

Das Chromatogramm (Abb. 25) zeigt, daß der Zerfall des Salzes in wässriger Lösung nach dem Erhitzen nicht dem Zerfall der Base in Methanol gleich ist. Die van Urk-Reaktion aller Zersetzungsprodukte ist positiv. Maxima und Minima der Salze in Wasser sind durch Verunreinigungen vieler Nebenreaktionen, die nicht nur durch Hitze ausgelöst werden, sondern auch vom Lösungsmittel und pH-Wert der Lösung abhängen, verschmiert

(Farbe: gelb, flockiger Niederschlag). Da keine Eigenfluoreszenz auftritt und die Farbreaktion mit van Urk-Reagens positiv ist, sind neu entstandene Chromophore unwahrscheinlich.

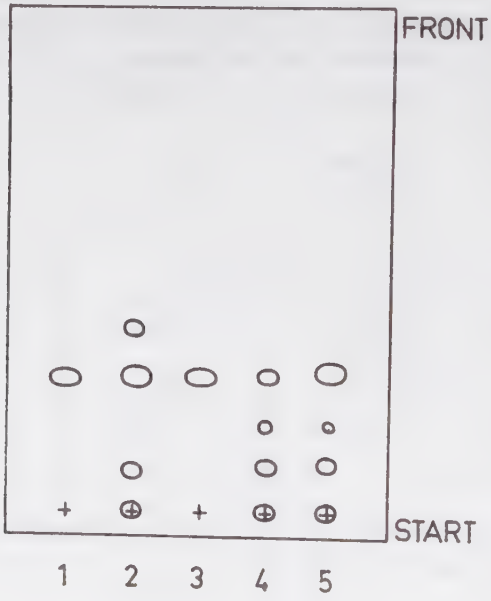


Abb. 25: Trennung der Zersetzungsprodukte erhitzter Alkaloidlösungen.
Mobile Phase: Diäthylamin 60 und n-Heptan 40,
Laufhöhe: 10 cm

1 = Dihydroergocristin, reinst;
2 = Dihydroergocristin in Methanol, 96 h 100 °;
3 = Dihydroergotoxinmethansulfonat und Hydergin^{R}, reinst;
4 = Dihydroergotoxinmethansulfonat in Wasser, 96 h 100 °;
5 = Hydergin^{R}, mit Wasser verdünnt, 96 h 100 °.

Eine Gegenüberstellung der UV-Kurven der zersetzten Lösungen der Basen und Salze (Abb. 26) zeigt, daß neben Licht und Hitze auch Lösungsmittel, Salzbildung und pH-Wert an der Zersetzung beteiligt sind. Gleiches zeigt das Chromatogramm (Abb. 25) der erhitzten Alkaloide. Bei Base und Salz ist neben den gleichen Zersetzungsprodukten ein Zersetzungsprodukt enthalten, das verschieden ist. Der Unterschied der UV-Kurven der Base in Methanol und des Salzes in Wasser nach dem Erhitzen beruht auf Reaktionen der Doppelbindungen im Indolsystem der Moleküle. Ferner können chinoide Formen entstehen.

Bei Lichtbestrahlung wird die van Urk-Reaktion negativ. Die UV-Kurven sind gegenüber den Ausgangssubstanzen verschieden. Chromatographisch lassen sich viele Zersetzungsprodukte nachweisen. Man kann nicht gezielt auf einen bestimmten veränderten Chromophor schließen, denn die UV-Kurven des Gemisches lassen keine Rückschlüsse auf die Chromophore zu.

Die UV-Kurven zeigen, daß die Zersetzung bei den Alkaloidsalzen in Wasser größer als bei den Basen in Methanol ist.

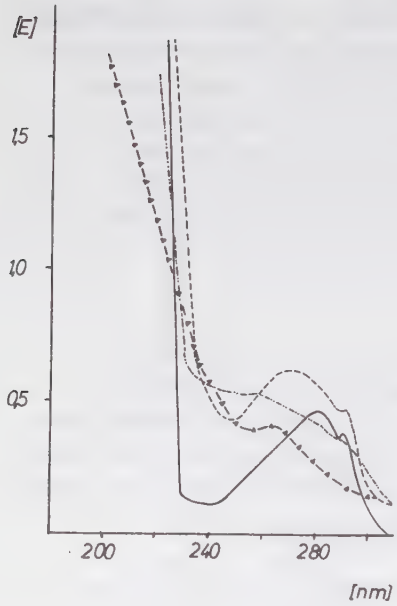


Abb. 26: Verschiebung der Hauptmaxima für Dihydroergocristin und Dihydroergotoxinmethansulfonat nach dem Erhitzen auf 100° oder Sonnenlichtbehandlung im Vergleich zum reinen Dihydroergocristin *.

(———) = Dihydroergocristin, reinst, Dihydroergotoxinmethansulfonat, reinst

(----) = Dihydroergocristin nach 96 h Sonnenlicht

(-·-·) = Dihydroergotoxinmethansulfonat nach dem Erhitzen auf 100 °

(-▲-) = Dihydroergotoxinmethansulfonat nach 96 h Sonnenlicht

---

* Die durchgezogene Kurve (———) für Dihydroergocristin entspricht im nm-Wert dem Hauptmaximum für Dihydroergotoxinmethansulfonat (Base: 280 - 82 nm (0,48), Salz: 280 nm (0,40)). Der Verlauf der Absorptionskurve erhitzten Dihydroergocristins entspricht bis auf leichte Erhöhung der Extinktionen (bei 4,5 mg / 100 ml : Extinktion bei 280 nm nach dem Erhitzen auf 100 ° 0,57, reines Produkt 0,48) dem der reinen Base.

Quantitative Bestimmungen der Zersetzungsprodukte und Untersuchungen zu ihrer Struktur.

Die auffällige Verschiebung der Maxima der Lösungen, die dem Sonnenlicht ausgesetzt waren, nach kürzeren Wellenlängen, die negative van Urk-Reaktion, und die Zersetzungsflecke auf dem Chromatogramm nach Hitzeeinwirkung warfen die Frage nach den Strukturänderungen der Substanzen auf. Die quantitative Bestimmung der Zersetzungsprodukte mit Hilfe des Spektralphotometers zeigte, zu welchen Anteilen sie nach Hitze- bzw. Lichtbehandlung anfielen. Nur diejenigen Produkte wurden präparativ aufgearbeitet, die auch nach längerer Behandlung der Ausgangssubstanzen noch in ausreichender Menge vorhanden waren.

Zur quantitativen Bestimmung des Restalkaloids wurden je nach Behandlung der Lösungen die beschriebenen Fließmittelkombinationen eingesetzt. Als Restalkaloid wurde der Fleck auf der Platte bezeichnet, der den gleichen Rf-Wert hatte, wie der entsprechende Fleck des reinen Alkaloids. IR-Spektren bestätigten in allen Fällen die Identität.

Zunächst wurde Dihydroergocristin in Methanol mit Sonnenlicht bestrahlt. Nur die Fläche des Restalkaloids (Abb. 27 u. 28, Bez. 2) läßt sich bei 285 nm im Spektralphotometer als direktes Maß für die vorhandene Menge unzersetzten Alkaloids auswerten, denn der Chromophor ist erhalten geblieben (van Urk-Reaktion positiv). Dagegen hat sich der Chromophor der Zersetzungsprodukte (Bez. 1 u. 3) (van Urk-Reaktion negativ) verändert, denn bei gleicher Wellenlänge wurde nicht die maximale Fläche des gebildeten Zersetzungsproduktes aufgezeichnet.

Ergebnis: Von der aufgetragenen Menge reinen Alkaloids blieben nach 96 h 10 proz. unzersetzt erhalten.

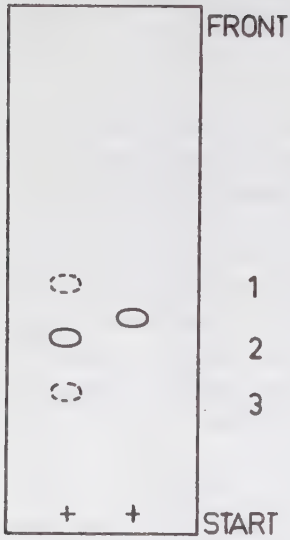


Abb.27: DC
Dihydroergocristin (2)
Zersetzungsprodukte nach
Bestrahlung (1, 3).

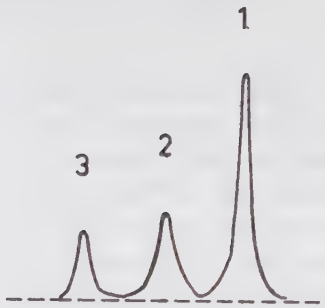


Abb. 28: Remissionsortskurve
Sonnenlicht zersetzten Di-
hydroergocristins;
(2) = Restalkaloid Di-
hydroergocristin
(1, 3) = Zersetzungsprodukte,
van Urk negativ.

Methanolische Lösungen des Dihydroergocristins wurden anschliessend dem Tageslicht ausgesetzt. Gleichzeitig wurde festgestellt, ob die Zersetzung vom Sauerstoffgehalt der Lösungen abhängig ist. Die nach 24, 48 und 96 h nach Behandlung mit Tageslicht gemessenen methanolischen Lösungen zeigten im Gegensatz zu den mit Sonnenlicht bestrahlten Produkten unabhängig davon, ob die Lösungen sauerstoffrei oder sauerstoffhaltig waren, keine Zersetzung.

Ergebnis:

Die Fläche des reinen Vergleichsproduktes von 274 mm^2 entsprach

der gemessenen Fläche der behandelten Produkte.

Die Alkaloidsalzgemische Dihydroergotoxinmethansulfonat und Hydergin^{R} zersetzen sich in wässriger Lösung, 96 h dem Sonnenlicht ausgesetzt, nahezu quantitativ. Mit der van Urk-Reaktion ließ sich kein Fleck auf der Dünnschichtplatte anfärben. Im Spektralphotometer wurde bei 285 nm keine meßbare Ortskurve aufgezeichnet, die unzersetztem Alkaloid entsprechen würde. Das Chromatogramm zeigt, daß nach dieser intensiven Bestrahlung der Alkaloid-Salzgemische in wässriger Lösung hauptsächlich ein durch Fluoreszenzlöschung sichtbarer Fleck entsteht, dessen Rf-Wert über dem des reinen Alkaloids liegt (Abb. 29, Bez. 2).

Ergebnis:
Als unzersetztes Alkaloid bleibt weniger als 1 proz.

Wie aus den Chromatogrammen des mit Sonnenlicht bestrahlten Dihydroergotoxinmethansulfonats zu entnehmen ist, zeichneten sich auf den Dünnschichtplatten weitere kleinere Zersetzungsflecke ab, die bis auf das unzersetzte Restalkaloid keine positive van Urk-Reaktion mehr gaben.

Zur quantitativen Bestimmung dieser Zersetzungsprodukte, deren Chromophor wahrscheinlich verändert war, wurden bei verschiedenen Wellenlängen spektralphotometrische Messungen vorgenommen. Die mit den Ziffern 1 bis 4 bezeichneten Zersetzungsprodukte des Chromatogramms (Abb. 29) waren durch Fluoreszenzlöschung sichtbar; sie gaben keine van Urk-Reaktion. In den Remissionsortskurven (Abb. 30) ist die Bezeichnung der Flecke beibehalten. Bei den Wellenlängen 236 und 265 nm erreichen die Flächen der Zersetzungsprodukte ihre Maxima. Als Vergleich ist die Messung bei 285 nm angeführt, bei der das reine Alkaloid eine maximale Fläche hätte. Der Zersetzungsfleck 1 wird dabei nicht registriert. Während die Flecke 3 und 4 auch bei kurzen Wellen-

längen keine großen Flächenunterschiede zeigen, sind die Flächen der Flecke 1 und 2 von den Wellenlängen stark abhängig.

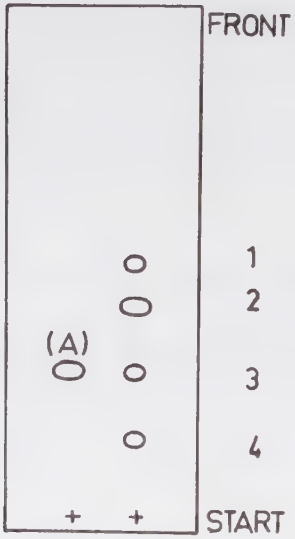


Abb. 29: Zersetzungsflecke des Dihydroergotoxinmethansulfonats nach Sonnenlichteinstrahlung.
(A) = Alkaloidgemisch

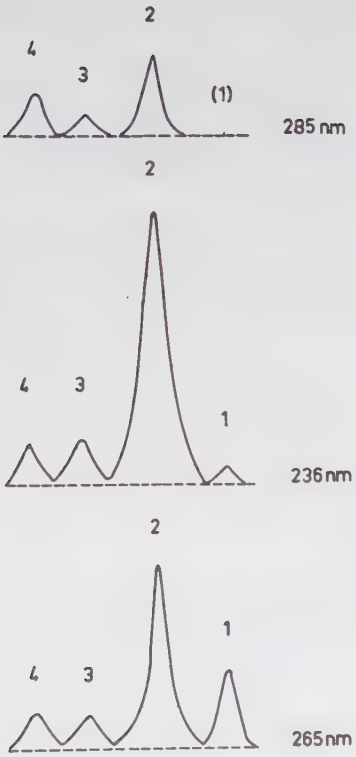


Abb. 30: Remissionsortskurven Licht zersetzten Dihydroergotoxinmethansulfonats bei verschiedenen Wellenlängen.

Aus den Flächen der Remissionsortskurven des durch Licht zersetzten Dihydroergotoxinmethansulfonats läßt sich das Verhältnis der zersetzten Produkte berechnen. So liegen die Zersetzungsprodukte 1 bei 265 nm zu 19 proz., 2 bei 236 nm zu 67 proz. und 3 und 4 bei 240 nm zu je 7 proz. vor.

Unter den gleichen Bedingungen wie bei Dihydroergocristin neigten die wässrigen Lösungen des Dihydroergotoxinmethansulfonats, ob sauerstoffhaltig oder sauerstoffrei, gegenüber dem Tageslicht zu stärkerer Zersetzung.

Ergebnis:
Nach 96 h Tageslichteinwirkung wurden noch 50 - 60 proz.
(= 179 mm^2) unzersetztes Alkaloid gefunden.

Vergleich der Meßreihen

Sonnenlicht verändert in wenigen Tagen, im Extremfall nach ein paar Stunden, den Chromophor des Moleküls so weitgehend, daß die Alkaloide auf der chromatographischen Platte keine van Urk-Reaktion mehr geben.

Für Dihydroergotoxinmethansulfonat wurde eine völlige Zersetzung in wässriger Lösung nach relativ kurzer Zeit (nach 96 h weniger als 1 proz. Dihydroergotoxinmethansulfonat) spektralphotometrisch festgestellt.

Gleiche Messungen an Dihydroergocristin in Methanol ergaben 70 proz. unzersetztes Alkaloid. Allerdings wurden auch diese Lösungen, wenn sie ein paar Tage starkem Sonnenlicht ausgesetzt wurden, so vollständig verändert, daß die van Urk-Reaktion negativ wurde.

Die Versuche zeigen, daß die wässrigen Lösungen der Alkaloidsalze gegen Sonnenlicht empfindlicher sind als die methanolischen der freien Base Dihydroergocristin.

Ähnliche Beobachtungen wurden UV-Spektroskopisch gemacht. Für Dihydroergotoxinmethansulfonat wurde eine Verschiebung von 280 nm (Maximum der reinen Alkaloide und ihrer Salze) nach 265 nm und für Dihydroergocristin eine Verschiebung nach 270 nm beobachtet.

Der Sauerstoffgehalt der Lösungen spielt bei dieser Zersetzung keine wesentliche Rolle, obgleich gerade im Licht radikalische Reaktionen, an denen der Sauerstoff teilnehmen könnte, bevorzugt ablaufen.

Ein großer Unterschied besteht zwischen dem Einwirken von Sonnenlicht und vom gestreuten Tageslicht. Versuche an Dihydroergo-

toxinmethansulfonat (nach 96 h blieben 50 - 60 proz. unzersetzt) und an Dihydroergocristin (nach 96 h noch keine Zersetzung) weisen auf eine höhere Stabilität beider Alkaloide gegenüber gestreutem Tageslicht hin.

Werden wässrige Alkaloidsalzlösungen in Arzneiflaschen aus braunem Glas in normal beleuchteten Räumen aufbewahrt, so findet keine Zersetzung statt, wie sie durch Sonnenlichteinwirkung zustande kommt (die van Urk-Reaktion bleibt positiv).

Es erübrigt sich daher zu untersuchen, ob die Alkaloidsalze in anderen Lösungsmitteln gegenüber dem Licht stabiler sein könnten.

Ein Schutz durch die Verpackung ist aber gegenüber der Einwirkung von Wärme nicht möglich, wodurch die Suche nach einem stabilisierenden Lösungsmittel notwendig wird.

Veränderungen am Molekül des Peptidalkaloids nach Sonnenlichtbestrahlung.

Es wurde Dihydroergotaminmethansulfonat verwendet, denn vom Dihydroergocristin, Dihydroergokryptin und Dihydroergocornin unterscheidet sich das Dihydroergotamin nur im Peptidring. Während die Aminosäurebausteine bei Dihydroergotamin und Dihydroergocristin gleich sind, enthält Dihydroergocristin die maskierte Dimethylbrenztraubensäure an Stelle der Brenztraubensäure im Dihydroergotamin. In den Peptidringen des Dihydroergokryptins und des Dihydroergocornins sind L-Leucin und L-Valin eingebaut, wo bei Dihydroergotamin L-Phenylalanin vorliegt.

Durch die Dimethylbrenztraubensäurekomponente wird bei Dihydroergocristin, Dihydroergokryptin und Dihydroergocornin die Ätherbrücke im Peptidring eventuell sterisch stärker abgeschirmt als bei Dihydroergotamin.

Da der Dihydrolysergsäureteil und damit das chromophore Indol-System bei den einzelnen Alkaloidsalzen des bisher in wässriger Lösung bestrahlten Dihydroergotoxinmethansulfonats und dem Dihydroergotaminmethansulfonat identisch ist, werden die strukturellen Veränderungen im Dihydrolysergsäureteil der einen Verbindung auch charakteristisch für die Veränderungen der anderen sein.

Ein Vergleich der UV-Spektren (Abb. 31) bestätigt diese Annahme.

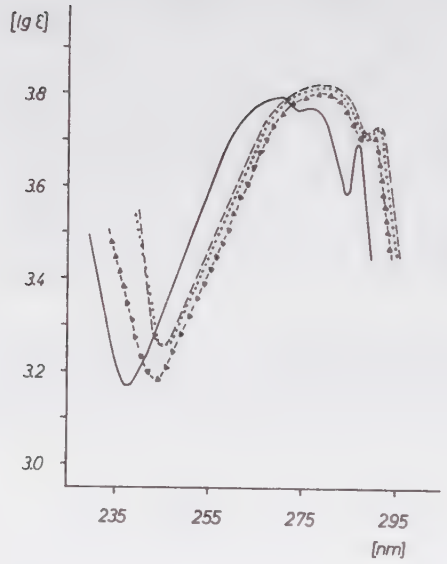


Abb. 31: UV-Absorptionskurven des Indols (———), der Dihydrolysergsäure (—▲—), des Dihydroergotamins (- - - - -) und des Dihydroergocristins (• • • •).

Die wässrige Lösung des Dihydroergotaminmethansulfonats wurde dem Sonnenlicht ausgesetzt. In Abständen wurde chromatographiert. Dabei wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und der Rückstand in Äthanol gelöst. Nach dem Besprühen mit dem van Urk-Reagens entstanden nicht mehr wie beim unbehandelten Produkt violett - blaue Flecke, sondern es entstand nach dem Aktivieren mit HCl-Dämpfen Gelbfärbung (Abb. 32).

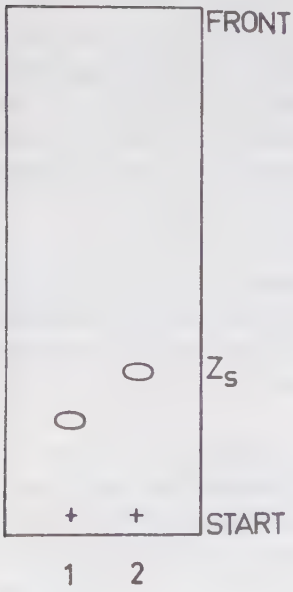


Abb. 32: Chromatographisches Bild unzersetzten und bestrahlten Dihydroergotaminmethansulfonats (Z_S).

(1) = Dihydroergotaminmethansulfonat, rein.
(2) = Dihydroergotaminmethansulfonat, im Licht zersetzt.

Mobile Phase: Chloroform 90, Äthanol 10, n-Heptan 5;

Laufhöhe 12 cm.

Nicht alle Indole geben mit dem van Urk-Reagens [15] die gleiche Färbung; z. B. reagiert Indol unter gleichen Bedingungen mit

---

15) Arzneimittel-Forsch. 4, 397 (1954)

roter und Tryptophan mit grün - blauer Färbung. Ferner kann der hydrierte Chinolinring im Dihydrolysergsäureteil des Peptidalkaloids durch Sonnenlichteinwirkung im schwach sauren Milieu strukturell so verändert worden sein, daß der Farbton des Reaktionsproduktes dadurch beeinflusst wird. Außerdem polymerisieren die Indole im Sonnenlicht. Die Polymerisationsprodukte lassen sich nicht quantitativ abtrennen und können so als gelbe Zonen die charakteristische Färbung des Indolabkömmlings decken. Ferner ist nicht auszuschließen, daß die Alkaloide mit den Lösungsmitteln reagieren.

Das Zersetzungsprodukt Z_s fiel nach weiterer präparativer Aufarbeitung in einem letzten Reinigungsschritt mit Aceton und Dioxan (1 : 1) als schwach hellgelb gefärbtes Pulver an (Abb. 33).

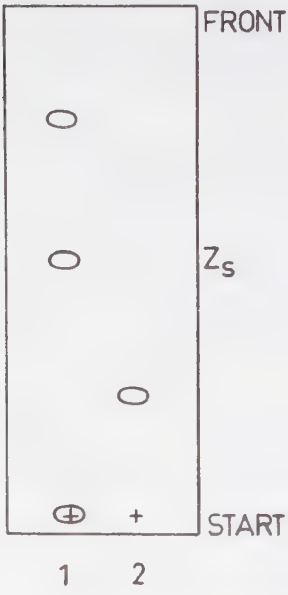


Abb. 33: Letzter Reinigungsschritt des Zersetzungsproduktes Z_s, mit Äthanol ausgezogen.

(1) = Z_s, durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und 365 nm sichtbar, gelbe Zonen (evtl. Polymerisate) am Start und an der Front.

(2) = Dihydroergotaminmethansulfonat, unbehandelt.

Laufhöhe 12 cm.

Die Untersuchung zur Aufklärung des Zersetzungsproduktes Z_S wurde mit der ^{13}C-NMR-Spektroskopie vorgenommen. Durch Vergleich mit Spektren von Modellsubstanzen war mit Hilfe der chemischen ^{13}C-Verschiebung ein Strukturvorschlag möglich[16].

Die Zuordnung der Signale im Peptidalkaloid Dihydroergocristin (Abb. 34 u. Abb. 35) gelang durch Vergleich mit Spektren von Verbindungen*, die Strukturteile des Alkaloids darstellen. Der Dihydrolysergsäureteil wurde mit ^{13}C-Spektren des 3-Methylindols, des 4-Methylindols und des N-Methylpiperidins verglichen; der Peptidteil mit ^{13}C-Spektren des Bisbenzoxazolinyls, des Phenylalanins und des Prolins.

Ein weiteres Molekül entsprechend der Lysergsäure oder Dihydrolysergsäure ohne Peptidteil war notwendig, um an Hand der chemischen Verschiebungen Strukturänderungen zu erkennen. Dafür stand Ergometrin (Ergobasin) zur Verfügung (Abb. 36 u. Abb. 37).

---

16) E. Breitmaier and W. Voelter, ^{13}C Spectroscopy-Methods and Applications, Verlag Chemie, Weinheim 1974

* Ich danke Herrn Professor Dr. E. Breitmeier für das umfangreiche Material.

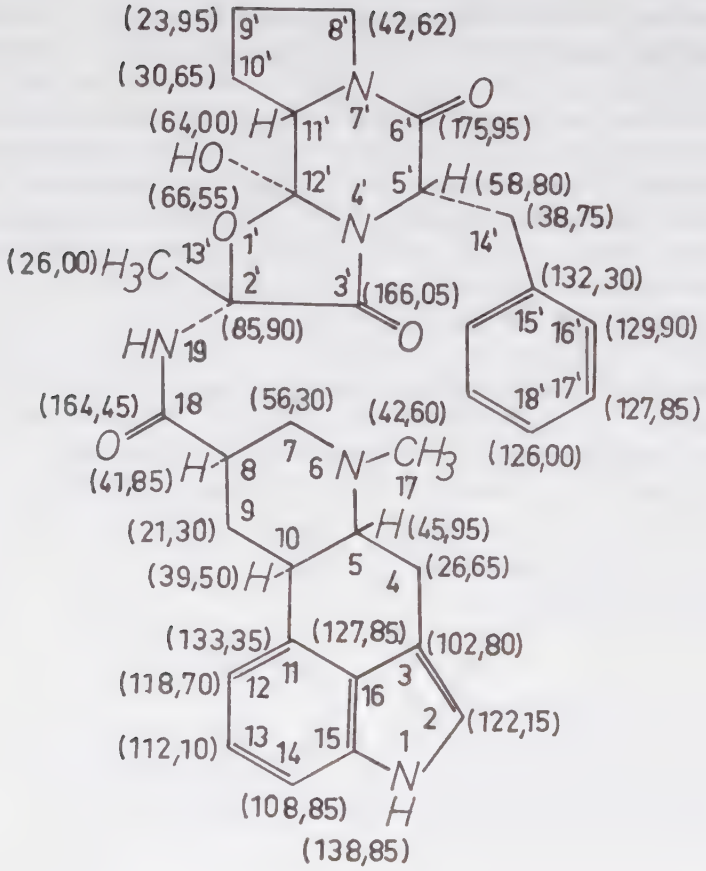


Abb. 34: ^{13}C-Signalzuordnung (-δ in ppm gegen TMS, vgl. Abb. 35) von Dihydroergotamin.

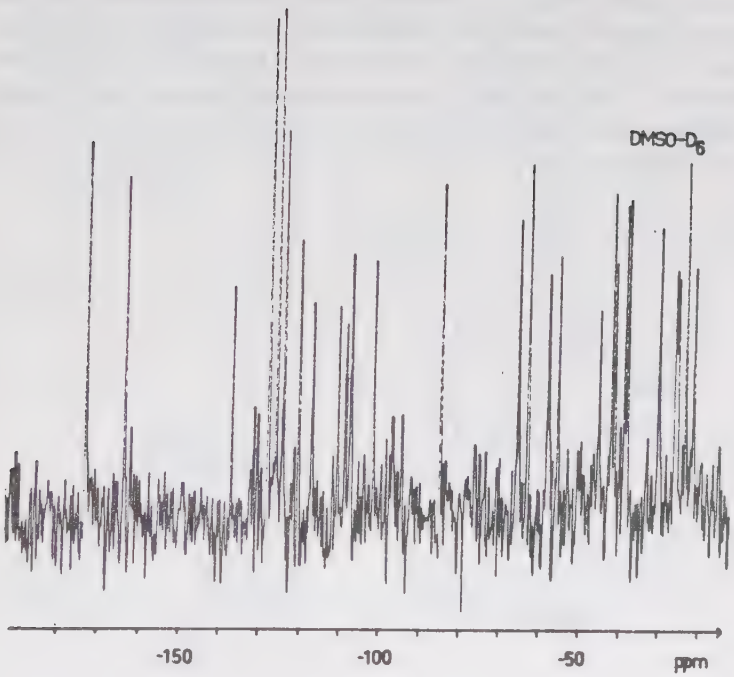
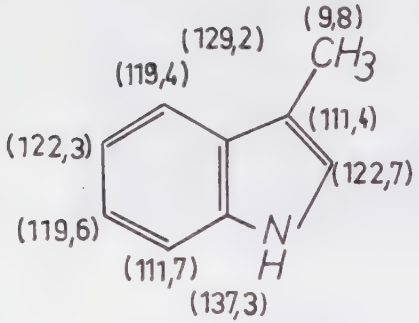


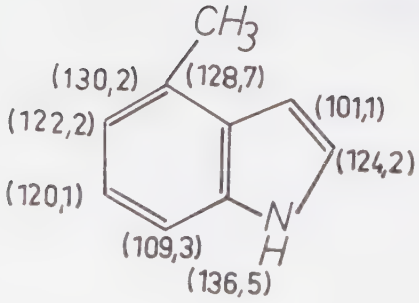
Abb. 35: ^{13}C-Spektrum von Dihydroergotamin ($(CD_3)_2SO$).

Ein Vergleich der ^{13}C-Signale des Ergolinkörpers im Dihydroergotamin mit denen einfacher Verbindungen, wie Indolen und Piperidinen, erleichterte die Zuordnung. Diese Gegenüberstellung war besonders wichtig wegen der vermuteten Strukturänderung an der α-Indolstelle des Moleküls. Man konnte so sicher feststellen, ob chemische Verschiebungen insbesondere im hydrierten Chinolinteil Veränderungen durch Substituenten anzeigten, die sich nicht hätten vermuten lassen.

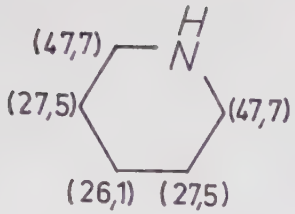
^{13}C-Signalzuordnung der Verbindungen:



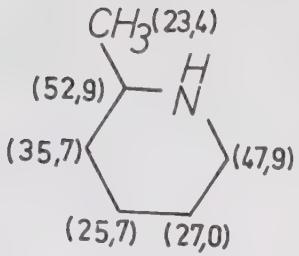
3-Methyl-indol



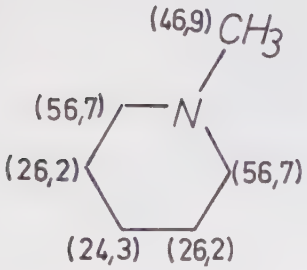
4-Methyl-indol



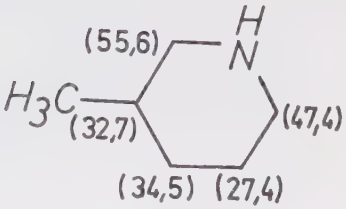
Piperidin



2-Methyl-piperidin



N-Methyl-piperidin



3-Methyl-piperidin

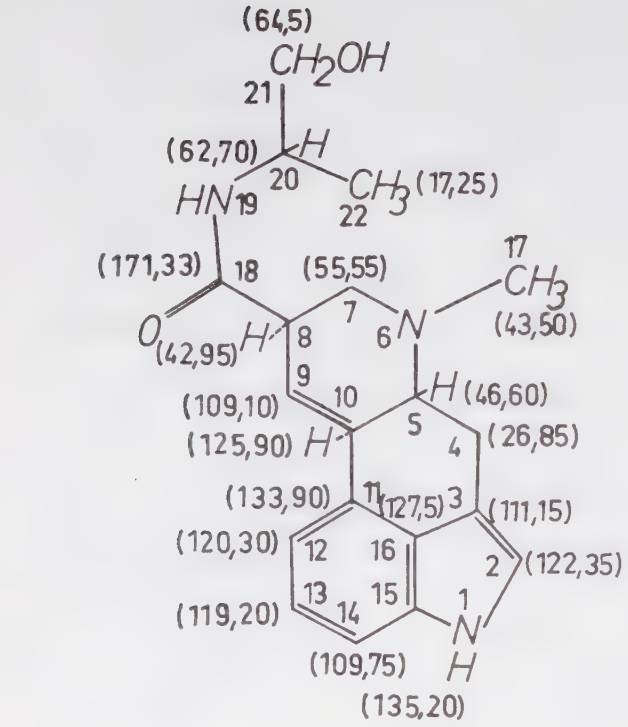
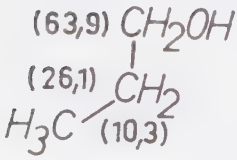


Abb. 36: ^{13}C-Signalzuordnung (-δ in ppm gegen TMS, vgl. Abb. 37) Ergobasin.



Ein Vergleich mit Aminopropanol erleichtert die Zuordnung der C-Atome C-20, C-21 und C-22.

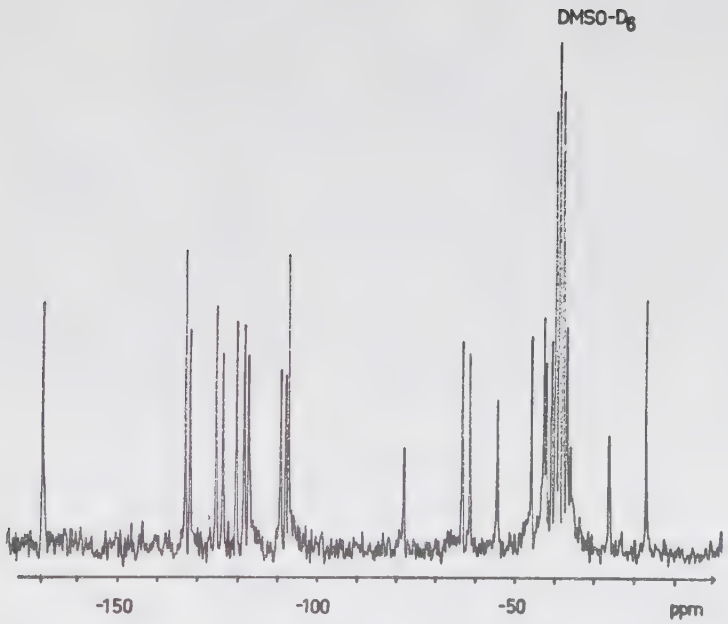
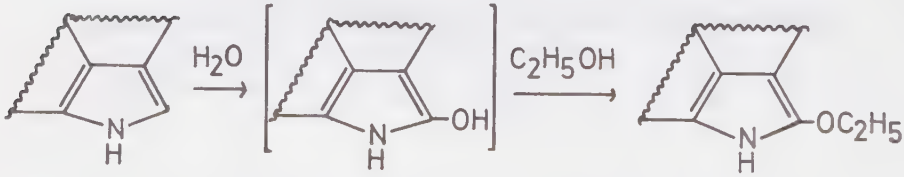


Abb. 37: ^{13}C-Spektrum von Ergobasin ($(CD_3)_2SO$)

Im Spektrum des Zersetzungsproduktes Z_s (Abb. 39) finden sich die ^{13}C-Signale des reinen Dihydroergotamins wieder (Abb. 35).

Zusätzlich deutet aber ein intensives ^{13}C-Signal bei δ = - 14,25 ppm (Theorie: - 14,3 ppm) auf eine Methylgruppe hin. Eine ^{13}C-Resonanz für C-2 (α-Stelle des Indolsystems) findet sich nicht im Spektrum des Zersetzungsproduktes. Sie müßte bei δ = - 122,14 ppm liegen. Da sich aber im Spektrum des Zersetzungsproduktes statt dessen ein deutliches Signal bei δ = - 145,65 ppm für C-2 zuordnen läßt, kann die α-Stelle des Indolsystems hydroxyliert worden sein bei der Bestrahlung des Alkaloids in wässriger Lösung. Wegen des Methylsignals bei δ = - 14,25 ppm und einer Methylengruppe, die sich auf die Resonanz bei δ = - 60,2 ppm (Theorie: - 60,1 ppm) zuordnen läßt, liegt nach der Reaktion des hydroxylierten Produktes mit seinem Lösungsmittel Äthanol in einer Sekundärreaktion eine Aethoxygruppe in der α-Stellung des Indolsystems vor.



Reaktion des Alkaloids mit den Lösungsmitteln in der α-Stellung des Indolsystems.

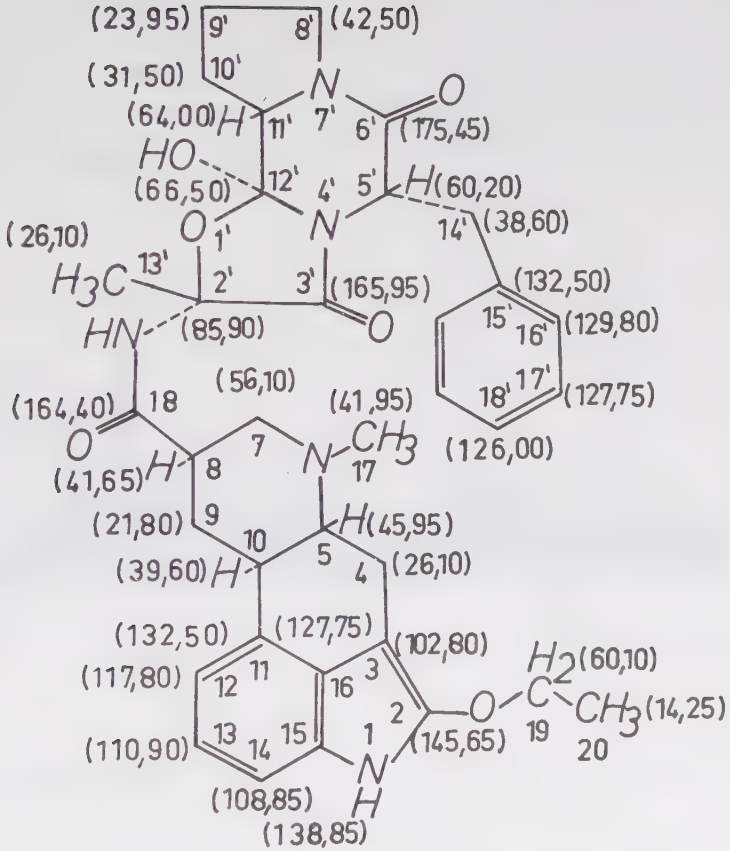


Abb. 38: ^{13}C-Signalzuordnung (- δ in ppm gegen TMS) und chemische Verschiebungen des Zersetzungsproduktes Z_s nach Sonnenlichtbestrahlung des Dihydroergotaminmethansulfonats in wässriger Lösung.

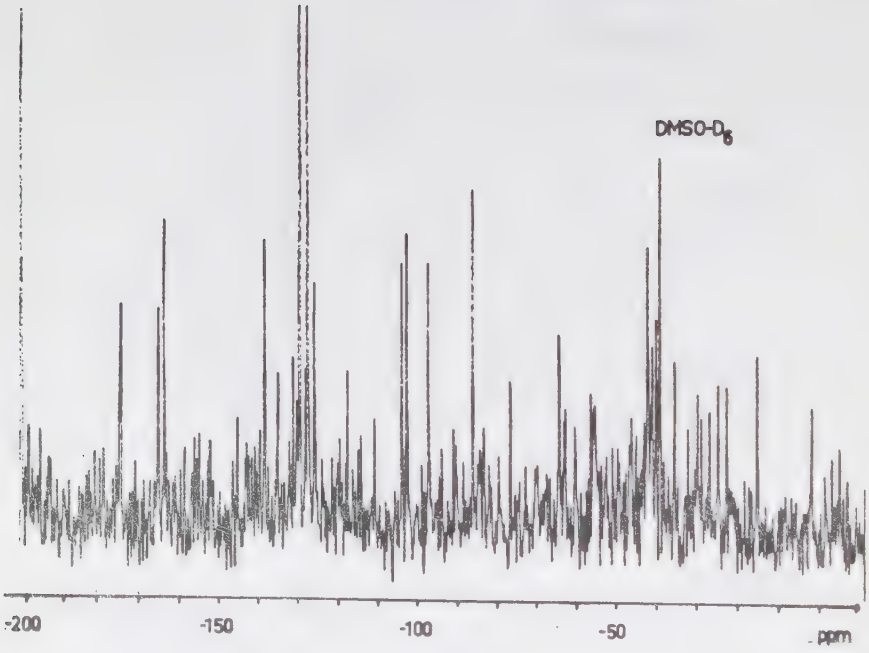


Abb. 39: ^{13}C-Spektrum von Z_s aus Dihydroergotaminmethansulfonat nach Sonnenlichtbestrahlung ($(CD_3)_2SO$).

Eine Äthoxygruppe in der α-Stellung des Indolsystems des Ergolinkörpers erklärt auch eine langwellige Verschiebung eines Maximums im UV-Spektrum (Abb. 40) aufgrund weiterer $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge. Vergleicht man das UV-Spektrum des reinen Dihydroergotamins (Maxima bei 280 u. 225 nm) mit dem des Zersetzungsproduktes, so fällt auf, daß das Zersetzungsprodukt neben drei Maxima bei 265, 235 und 215 nm ein flaches Maximum bei 335 nm aufweist.

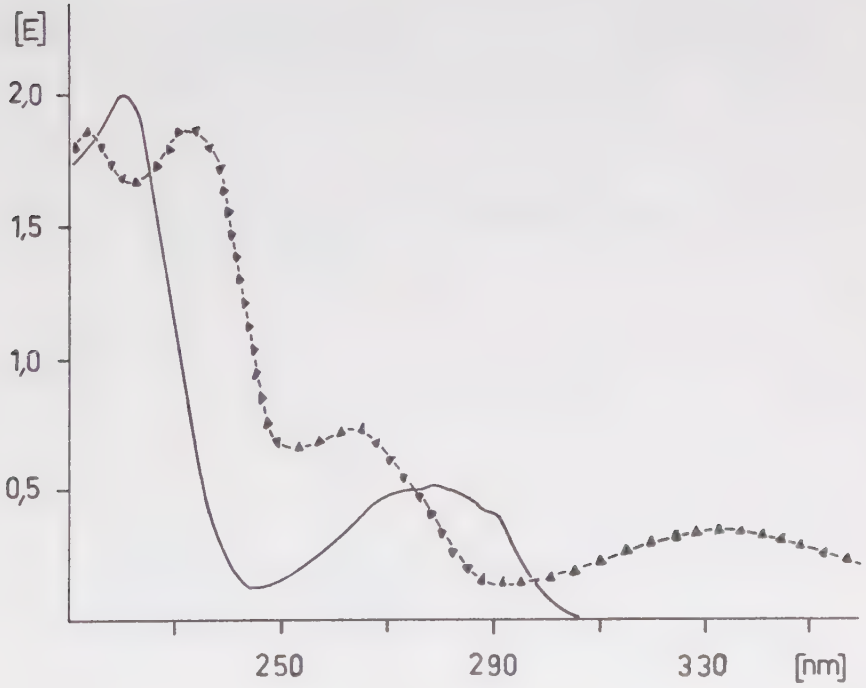


Abb. 40: UV-Spektren des Dihydroergotamins (4,5 mg / 100 ml Methanol, ——) und des Zersetzungsproduktes Z_s (3,6 mg / 100 ml Methanol, -▲-).

Auch das Massenspektrum bestätigt eine Äthylgruppe gebunden über ein Sauerstoff-Atom am C - 2 des Indolsystems im Dihydroergotamin.

Im vorliegenden Spektrum (Abb. 41) fehlt der charakteristische Peak $\frac{m}{e}$ 269, der durch Abspaltung des Peptidringes im Alkaloid den Dihydrolysergsäureamidteil anzeigt (Abb. 42). Nur die Massenzahl des vollständigen Peptidkörpers (M^+ 314) und seine Fragmentierung (Abb. 41, Abb. 43) können analysiert werden.

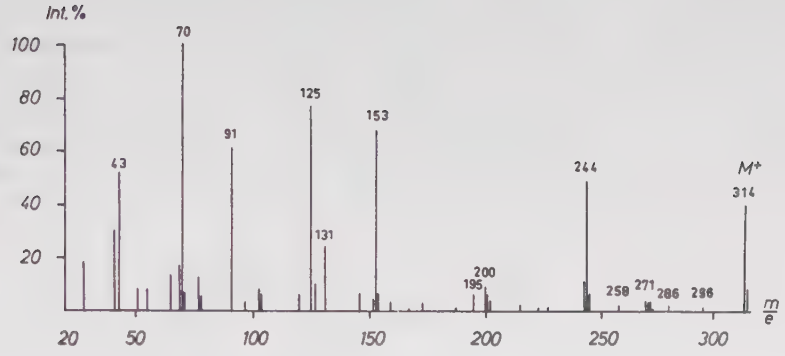


Abb. 41: Massenspektrum von Z_s aus Dihydroergotamin nach Sonnenlichtbestrahlung.

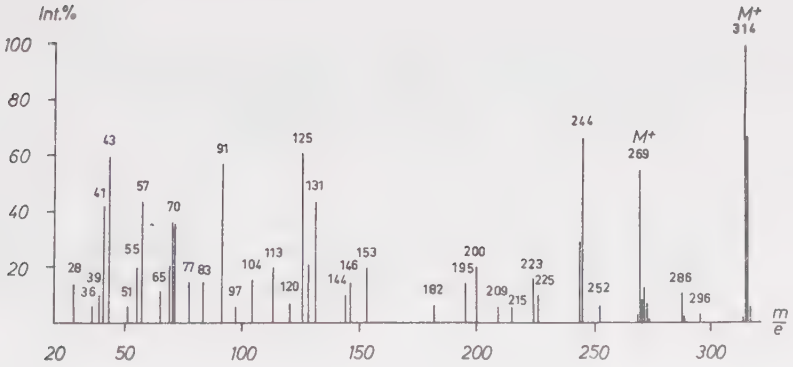


Abb. 42: Massenspektrum des Dihydroergotamins.

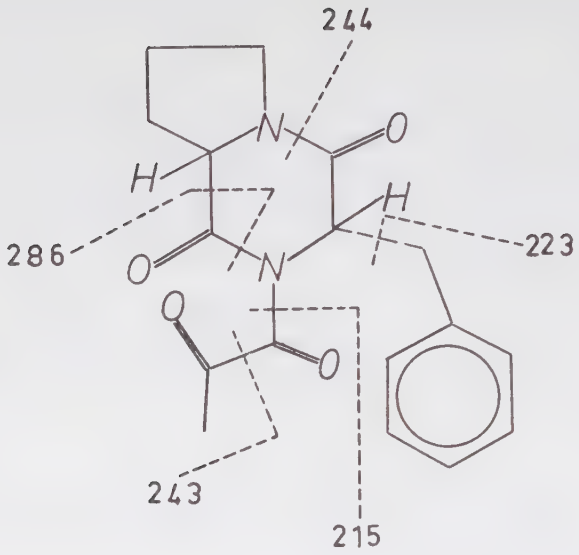


Abb. 43: Fragmentierung des Peptidteils des reinen Alkaloids Dihydroergotamin.

M^+ 314 C_{17} H_{18} N_2 O_4

C_{17} H_{18} N_2 O_4 - CO = 286
C_{17} H_{18} N_2 O_4 - C_2 H_3 O = 271
C_{15} H_{15} N_2 O_3 - CO = 243
C_{14} H_{15} N_2 O_2 - CO = 215

C_{17} H_{18} N_2 O_4 - C_7 H_7 = 223
C_{17} H_{18} N_2 O_4 - C_4 H_8 N = 244

M^+ 314 ist aber auch der Molekülpeak des in saurer Lösung durch eine photochemische Reaktion am C - 2 veränderten Dihydrolysergsäureamids; denn die Massenzahl des Dihydrolysergsäureamids zusammen mit der Äthoxygruppe ergibt 314 ME. Die Fragmentierung entspricht diesen Vermutungen. Für die Gruppierung an C - 2 ist die Abspaltung eines Olefins ($M^+ - 28$; $\frac{m}{e}$ 286) und die folgende Eleminierung eines Carbonyls zu $\frac{m}{e}$ 258 (Abb. 44) bezeichnend.

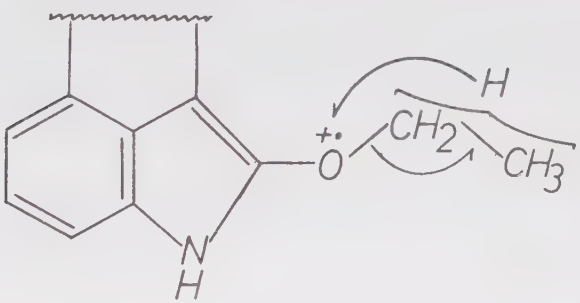


Abb. 44: Charakteristische Fragmentierung der Äthoxygruppe an C - 2 im Zersetzungsprodukt.

Dieser Peak ist nicht im Spektrum des unbehandelten Dihydroergotamins (Abb. 42) zu finden.

Die Vermutung aus den ^{13}C-Spektren der Einführung einer Hydroxylgruppe in wässriger Lösung und in einer Sekundärreaktion deren Aethylierung in Äthanol zu einer Aethoxygruppierung erhärtet sich mit dem langwelligen UV-Spektrum und der Fragmentierung des Massenspektrums, in dem M^+ 269 fehlt und die Fragmentierung eines Äthers vorliegt. Dafür spricht auch die negative van Urk-Reaktion.

Zersetzung des Dihydroergocristins und des Dihydroergotoxinmethansulfonats bzw. Hydergins^{R} in der Hitze.

Nach dem Erhitzen methanolischer Lösungen des Dihydroergocristins auf 100 ^{o} entstanden drei Zersetzungsflecke von kleinerem und größerem Rf-Wert als der des unbehandelten Dihydroergocristins (Abb. 45, Abb. 46). Alle Flecke zeigen eine positive van Urk-Reaktion.

Der Chromophor ist also weitgehend erhalten geblieben. Die Remissionskurve (Abb. 46) macht die Verteilung der Flecke sowie das Verhältnis ihrer Flächen deutlich.

Ergebnis:
Von der aufgetragenen Menge reinen Alkaloids blieben nach 96 h Erhitzen auf 100 ^{o} 75 proz. unzersetzt erhalten.

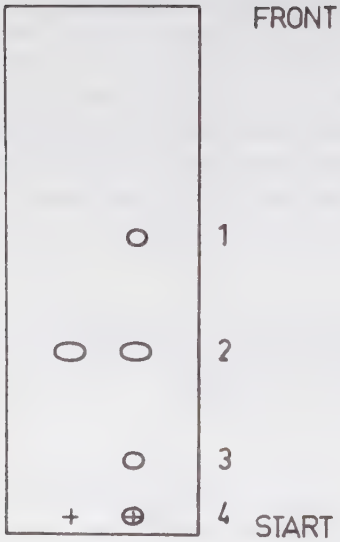


Abb. 45: Chromatogramm Dihydroergocristin nach dem Erhitzen.

(2) = Restalkaloid
(1, 3, 4) = Zersetzungsprodukte.

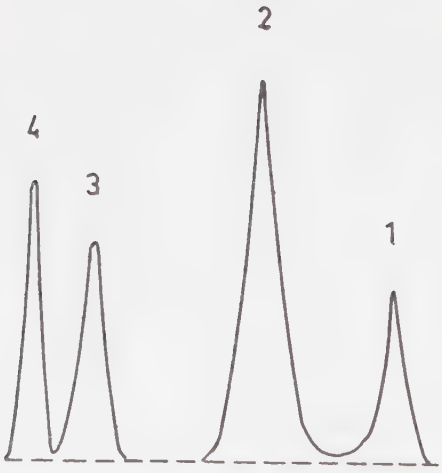


Abb. 46: Remissionsortskurve von Dihydroergocristin nach dem Erhitzen.

(2) = Restalkaloid
(1, 3, 4) = Zersetzungsprodukte.

Der Sauerstoffgehalt beeinflusst die Zersetzung unter Hitzeeinwirkung recht wenig. Nach dem Erhitzen entstanden keine nennenswerten Flächenunterschiede zwischen sauerstoffhaltigen und sauerstoffreien Lösungen. Nach 24 h wurde in beiden Fällen noch keine Zersetzung festgestellt (210 mm^2 = 100 proz.), nach 48 h waren noch 80 proz. und nach 96 h mindestens 55 proz. unzersetztes Alkaloid enthalten.

Trotz gleicher Zahl der Zersetzungsflecke (Abb. 47) werden die wässrigen Lösungen des Dihydroergotoxinmethansulfonats und des Hydergins^R quantitativ verschieden stark zersetzt. Die unterschiedliche Stabilität des Dihydroergotoxinmethansulfonats und des Hydergins^R in wässriger Lösung wurde nach längerem Erhitzen besonders deutlich.

Ergebnis:
Für Dihydroergotoxinmethansulfonat bleibt weniger als 1 proz. Restalkaloid, während für Hydergin^R 25 proz. unzersetztes Alkaloid erhalten bleibt.

Bei wiederholten Messungen waren die erhaltenen Flächenwerte nach diesem starken Erhitzen von zweimal 96 h nicht immer einheitlich. Insbesondere wurden für Dihydroergotoxinmethansulfonat auch Werte erreicht, die über 1 proz. unzersetztem Alkaloid lagen; in Abb. 47 ist das Chromatogramm, in Abb. 48 der quantitative Verlauf der Remissionsortskurven für beide Proben dargestellt.

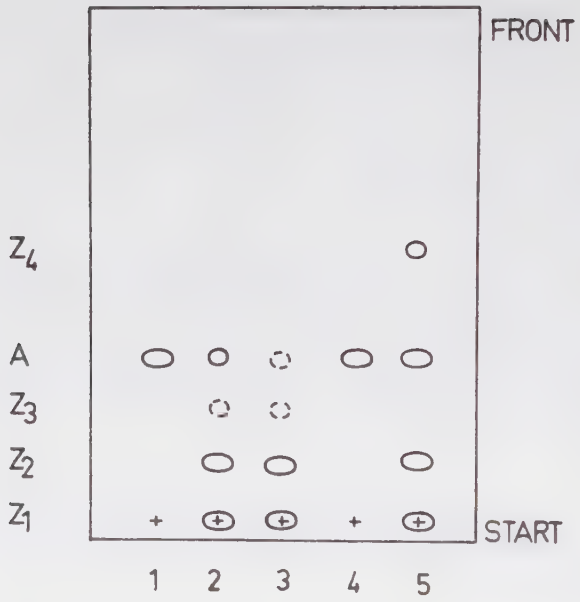


Abb. 47: Zersetzungsprodukte der Alkaloidsalze in wässriger Lösung nach 192 h und der Base in Methanol nach 96 h Erhitzen auf 100 °.

(1) = Dihydroergotoxinmethansulfonat / Hydergin^{R}, unbehandelt;
(2) = Erhitztes Hydergin^{R};
(3) = Erhitztes Dihydroergotoxinmethansulfonat (wässrig);
(4) = Dihydroergocristin, unbehandelt;
(5) = Dihydroergocristin, erhitzt 96 h in Methanol.

Die gestrichelt gezeichneten Produkte fallen kaum meßbar an.

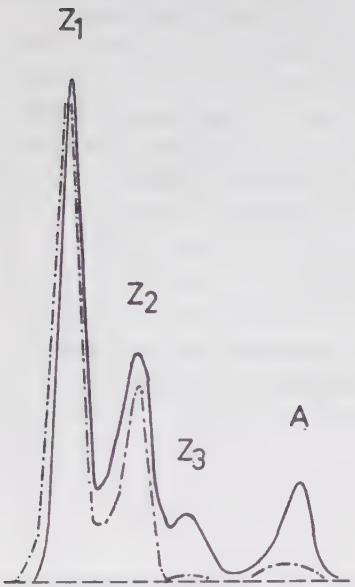


Abb. 48: Remissionsortskurve für Hydergin^{R} (———) (verd. mit Wasser), Dihydroergotoxinmethansulfonat (—·—·) (wässrig) nach dem Erhitzen von 192 h.

Bez. entspricht Abb. 47.

Die Übersicht (Abb. 47) zeigt die Zersetzungsprodukte nach dem Erhitzen. Bei den Alkaloidsalzen in wässriger Lösung * fallen primär zwei Zersetzungsprodukte gleichen Rf-Wertes an, Z_1 und Z_2, die sich auch bei der Base in Methanol gebildet haben. Erst nach 192 h Erhitzen bei 100 ^{o} bildet sich in der wässrigen Lösung der Salze ein drittes Zersetzungsprodukt Z_3. Quantitativ meßbar wird es erst, wenn das Alkaloid soweit abgebaut ist, daß

---

* Die Hydergin^{R}-Ampullen wurden geöffnet, die Stammlösung mit Wasser auf den entsprechenden Gehalt eingestellt und erst dann belastet.

es nur noch zu einem geringen Prozentsatz in der Lösung vorliegt. Nach weiterem Erhitzen bilden sich weder in der einen noch in der anderen Lösung Zersetzungsprodukte hinzu.

Für die durch Hitzeeinwirkung entstandenen Zersetzungsprodukte eignet sich zur Bestimmung der Flächen die Wellenlänge 285 nm, wie sie auch bei den reinen Produkten eingestellt wird. Das ist ein Zeichen dafür, daß bei dem Erhitzen hauptsächlich Spaltprodukte entstehen, deren Chromophor erhalten geblieben ist.

Bei den erhitzten wässrigen Lösungen der Salze war auch keine bemerkenswerte Abhängigkeit der Zersetzung vom Sauerstoffgehalt zu verzeichnen.

Vergleich der Meßreihen.

Unter den angewandten extremen Bedingungen sind die wässrigen Lösungen des Dihydroergotoxinmethansulfonats verhältnismäßig labil. Nach 192 h bei 100 ^{o} haben sich die Alkaloidsalze in Wasser ohne Zusätze völlig zersetzt. Stabilisierende Zusätze, vermutlich im Hydergin^{R}, verhindern eine völlige Zersetzung (bei gleichen Bedingungen 25 proz. unzersetzt).

Die freie Base Dihydroergocristin in methanolischer Lösung ist wesentlich stabiler. Nach 96 h ist noch 75 proz. unzersetzt, für Dihydroergotoxinmethansulfonat unter gleichen Bedingungen 40 - 50 proz. Für Dihydroergocristin in Methanol bleibt das Maximum im UV-Spektrum bei 280 nm erhalten, während für Dihydroergotoxinmethansulfonat in Wasser das Maximum bei 280 nm und das Minimum bei 240 nm zusammenfallen und bei 256 nm ein Maximum angedeutet ist.

Der Sauerstoffgehalt wirkt auf die Zersetzung kaum beschleunigend.

Auch Hitze zersetzt die schwach sauren wässrigen Lösungen der Alkaloidsalze stärker als die freien Basen in Methanol.

Strukturelle Aufklärung chromatographisch erfaßter Zersetzungsprodukte nach dem Erhitzen.

In schwach saurer, wässriger Lösung des Dihydroergotoxinmethansulfonats entstanden auch nach längerem Erhitzen auf 100 ° mit verschiedenen chromatographischen Systemen nicht mehr als zwei, bei der Base in Methanol aber drei Zersetzungsprodukte (Abb. 49 Z_1 u. Z_2, bzw. Z_3, Abb. 50 Z_1 u. Z_2 bzw. Z_3).

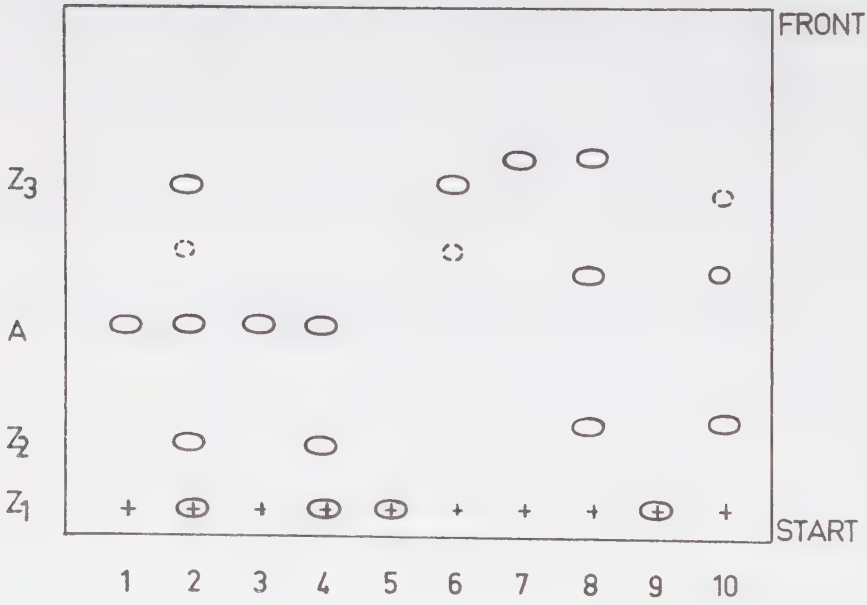


Abb. 49: Mobile Phase: Diäthylamin 60 u. n-Heptan 40

1 = Dihydroergocristin
2 = Dihydroergocristin 100 °
3 = Dihydroergotoxinmethansulfonat
4 = Dihydroergotoxinmethansulfonat 100 °
5 = Dihydrolysergsäure
6 = Dihydrolysergsäure 100 °
7 = Indol
8 = Indol 100 °
9 = Tryptophan
10 = Tryptophan 100 °

Z = Zersetzungsprodukt
A = Peptidalkaloid

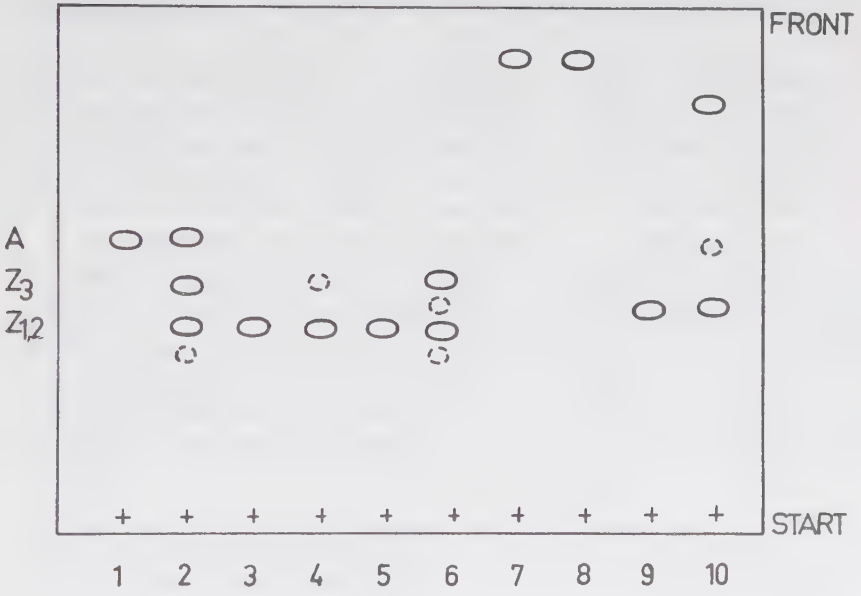


Abb. 50: Mobile Phase: Ameisensäuremethylester 40, Butanol 40 u. verdünnte Essigsäure 20.

1 = Dihydroergocristin
2 = Dihydroergocristin 100 °
3 = Dihydrolysergsäureamid
4 = Dihydrolysergsäureamid 100 °
5 = Dihydrolysergsäure
6 = Dihydrolysergsäure 100 °

7 = Indol 8 = Indol 100 °
9 = Tryptophan 10 = Tryptophan 100 °

Z = Zersetzungsprodukt A = Peptidalkaloid

Die Bildung dieser Zersetzungsprodukte war pH-unabhängig; sie bildeten sich nach starker Belastung von mehreren Tagen sowohl bei Alkaloidsalzen in wässriger Lösung (ca. pH 6), als auch nach Zusatz von Methansulfonsäure bei pH 4,3. Alle Produkte zeigten eine positive van Urk-Reaktion (violett - blau).

Gleichzeitig mit diesen Peptidalkaloiden wurden Verbindungen erhitzt, die Teilstrukturen des Alkaloidmoleküls darstellen, wie Dihydrolysergsäure, Dihydrolysergsäureamid, Indol und Tryptophan in Methanol. Aufgrund gleicher Rf-Werte sollten so gleiche Abbauprodukte an den weniger komplizierten Molekülen identifiziert werden. Jedoch zeigten nur Dihydrolysergsäure und Dihydrolysergsäureamid gleiche Rf-Werte, wie die beiden Abbauprodukte Z_1 und Z_2 der Peptidalkaloide (Abb. 49 u. Abb. 50).

Ein weiterer Zersetzungsfleck der Dihydrolysergsäure in Methanol (Z_3, Abb. 49 u. Abb. 50) war chromatographisch identisch mit Z_3 der Peptidalkaloide.

Es lag daher nahe, für die Strukturaufklärung von Z_3 das Zersetzungsprodukt des Dihydroergocristins und der Dihydrolysergsäure zu isolieren. In Z_1 und Z_2 konnten die Dihydrolysergsäure und das Dihydrolysergsäureamid als Abbauprodukte der Peptidalkaloide vermutet werden.

Zersetzungsprodukte Z_1 und Z_2

Die Zersetzungsprodukte Z_1 und Z_2 wurden als hellgelbe Pulver isoliert. Nach mehrmaligem Umkristallisieren von Z_1 (vermutete Dihydrolysergsäure) in Wasser und von Z_2 (vermutetes Dihydrolysergsäureamid) in Methanol wurden weiße, kristalline Pulver erhalten.

Von diesen Produkten wurden UV-, IR-, NMR- und Massenspektren angefertigt.

Die Maxima beider Produkte liegen bei 280 nm und die Minima bei 245 nm. Die Werte bestätigen, daß das chromophore System des Dihydrolysergsäureanteils nach dem Erhitzen der Peptidalkaloide in Z_1 und Z_2 erhalten geblieben sein muß.

Vergleichs-IR-Spektren zu der vermuteten Dihydrolysergsäure und Dihydrolysergsäureamid (Abb. 51 Z_1 u. Abb. 52 Z_2) wurden von Lysergid (Abb. 53) aufgenommen. Charakteristisch in den Spektren von Z_1 und dem Lysergid sind die starken Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen 3200 cm^{-1} und 3500 cm^{-1}; die Absorptionsbande des Indolstickstoffs liegt bei LSD um 3300 cm^{-1} und bei der Dihydrolysergsäure um 3260 cm^{-1}. Beide Produkte zeigen um 1600 cm^{-1} nur Carbonyl-Absorption.

Die charakteristischen Absorptionen bei 3200 cm^{-1} und 3390 cm^{-1}, sowie bei 1605 cm^{-1} und 1630 cm^{-1} weisen darauf hin, daß ein primäres Amid (Abb. 52) in Z_2 vorliegt. Ferner enthalten die Spektren einige charakteristische Banden, die im einzelnen nicht zugeordnet werden können, aber in einer Tabelle (s. unter Beschreibung der Versuche, S. 168) mit Banden anderer Peptidalkaloide verglichen werden.

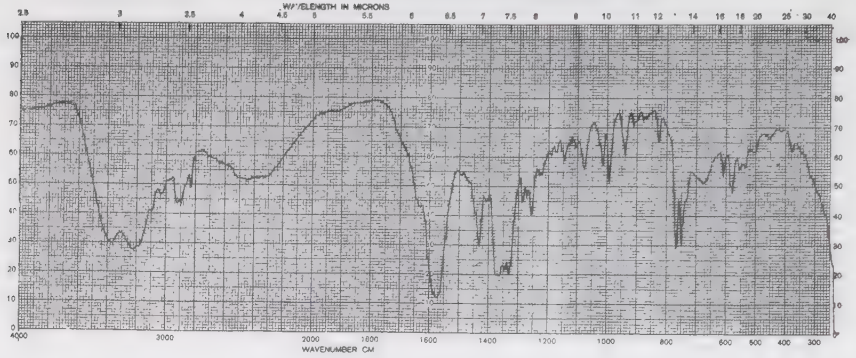


Abb. 51: IR-Spektrum von Dihydrolysergsäure (Z_1), (KBr)

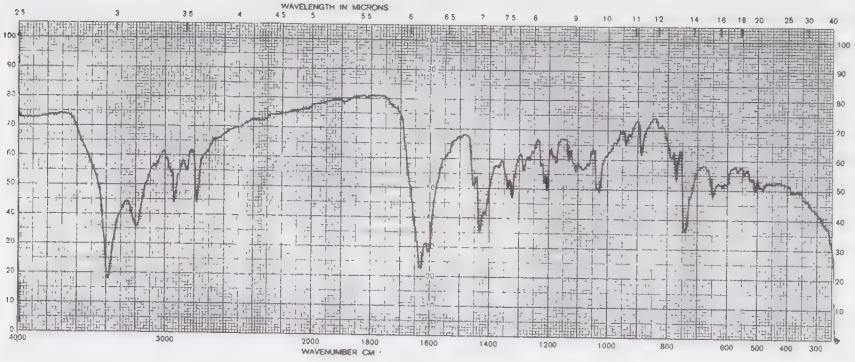


Abb. 52: IR-Spektrum von Dihydrolysergsäureamid (Z_2), (KBr)

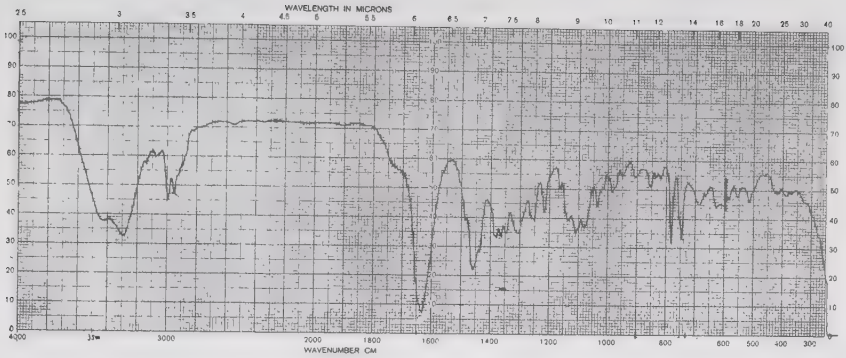
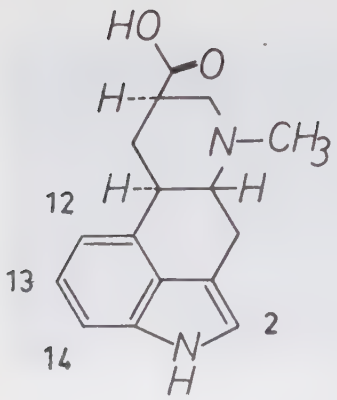


Abb. 53: IR-Spektrum von Lysergid (KBr)

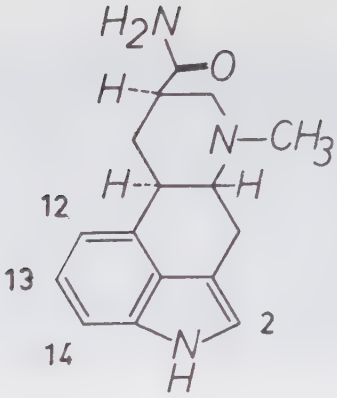
Die Aussagen über die folgenden NMR-Spektren orientieren sich an Arbeiten von K. Bailey und A. A. Grey [17], die mit einem 220 MHz-Gerät gearbeitet haben. Die hier abgebildeten Spektren wurden mit einem 60 MHz-Gerät aufgenommen.

---

17) Canad. J. Chem. 50, 3876 (1972)



Dihydrolysergsäure



Dihydrolysergsäureamid

Das Spektrum von Z_1 (vermutete Dihydrolysergsäure), (Abb. 54) wurde in Eisessig aufgenommen. Die aromatischen Protonen H_2, H_{12}, H_{13} und H_{14} zwischen δ = 6,2 u. δ = 7,3 ppm assoziieren stark. Alle restlichen 12 aliphatischen Protonen überlappen im Bereich von δ = 2 - 4 ppm.

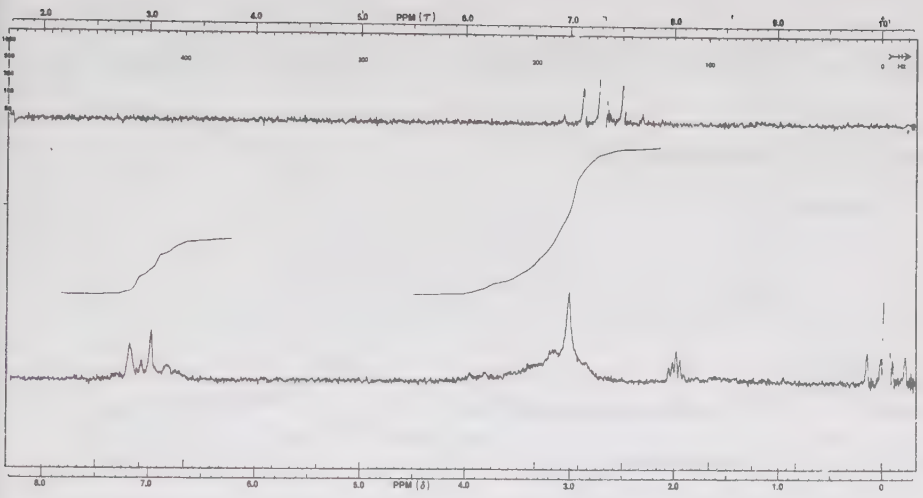


Abb. 54: NMR-Spektrum von Dihydrolysergsäure (Z_1), (Eisessig-D_4).

Eine ähnliche Anhäufung der Signale ohne Auflösung der einzelnen Protonen liegt im NMR-Spektrum des Zersetzungsproduktes Z_2 vor (Abb. 55) . Das Integral ergibt die Anzahl der aromatischen und aliphatischen Protonen des Dihydrolysergsäureamids; charakteristisch für die beiden mit D_2O austauschbaren Protonen des primären Amids ist das Signal bei δ = 3,4 ppm.

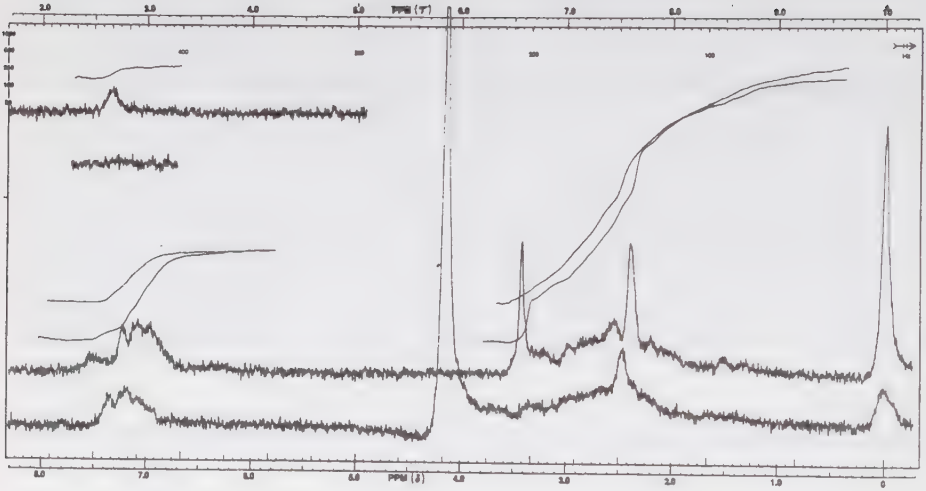


Abb. 55: NMR-Spektrum von Dihydrolysergsäureamid (DMSO - D_6)

Die NMR-Spektren der Zersetzungsprodukte Z_1 und Z_2 bestätigen also die Vermutung aus den IR-Spektren, daß es sich hier um Dihydrolysergsäure und Dihydrolysergsäureamid handelt.

Die Massenspektren von Z_1 und Z_2 wurden mit dem Massenspektrum des Dihydroergocristins verglichen (Abb. 56 Z_1, Abb. 57 Z_2 u. Abb. 58 Dihydroergocristin).

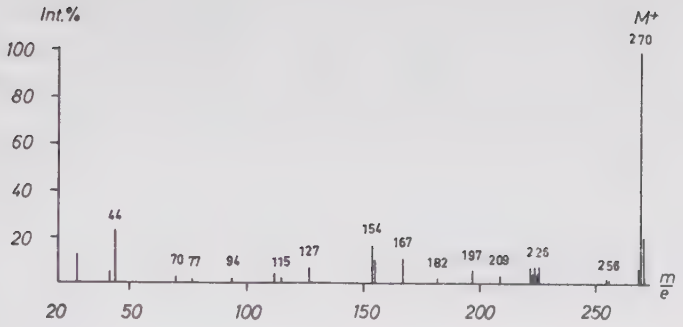


Abb. 56: Massenspektrum von Dihydrolysergsäure (Z_1)

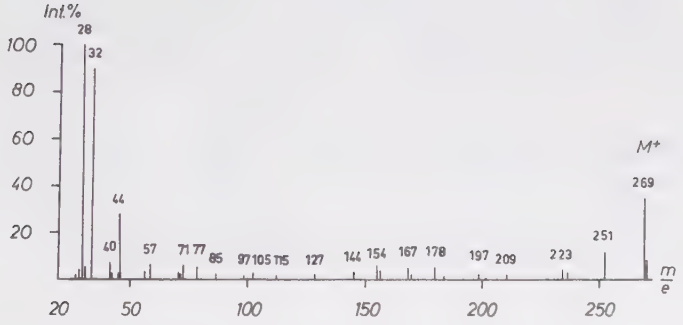


Abb. 57: Massenspektrum von Dihydrolysergsäureamid (Z_2)

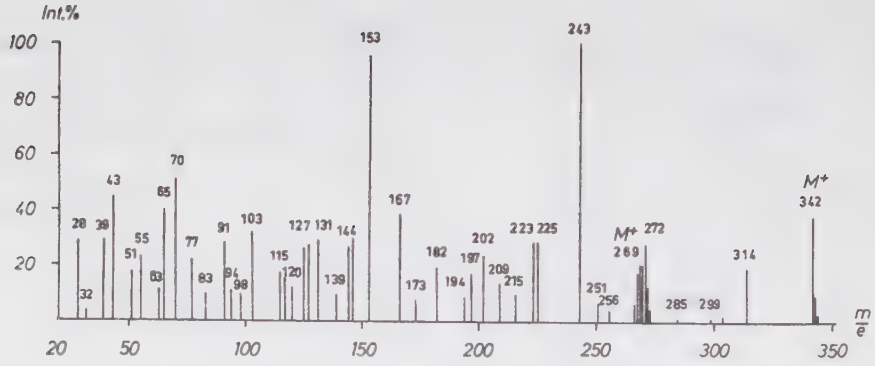


Abb. 58: Massenspektrum von Dihydroergocristin

Bei Dihydroergocristin zeigt sich wieder der charakteristische Zerfall in den Peptidteil (M^+ 342) und den Dihydrolysergsäureamidteil (M^+ 269). Die Fragmentierung des Peptidringes verläuft analog der des Peptidringes von Dihydroergotamin.

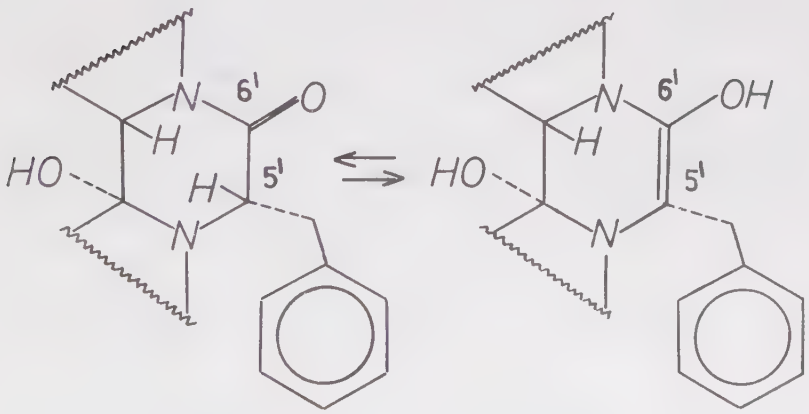
Aus der Literatur [18] war bekannt, daß der saure Wasserstoff der tertiären Hydroxylgruppe am C - 12' sich an den sekundären Stickstoff der Carbamidbindung an C - 8 anlagern sollte. Danach wurden die Peptidalkaloide thermisch bei 220 °C im Dowtherm * in einen Peptidteil und einen Amidteil zerbrochen, ohne daß ein

---

18) A. Hofmann, Die Mutterkornalkaloide, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1964, S. 82.
Helv. chim. Acta 39, 776 (1956)

* Apparatur zur Pyrolyse

C-Atom verloren ging. Nach damaligen Vermutungen war eine Spaltung deshalb möglich, weil sich das bewegliche H-Atom der tertiären OH-Gruppe in C - 12' an das sekundäre Stickstoffatom in C - 8 anlagerte und so eine Spaltung eintreten konnte. Da im Massenspektroskop ähnliche Verhältnisse vorliegen, lag es nahe, diese Vermutungen durch Deuterierungsversuche zu erhärten. Anhand der Verschiebung des M^+ 269 ließ sich feststellen, wie viele Protonen im Dihydrolysergsäureamidteil durch schweren Wasserstoff ersetzt worden waren. Austauschbar sind im Amidteil der Indolwasserstoff und der Wasserstoff des sekundären Stickstoffs der Carbamidgruppe; im Peptidteil der Wasserstoff aufgrund von Keto-Enol-Tautomerie in C - 5'.



Keto-Enol-Tautomerie im Peptidteil.

Aus den Prozentangaben über die Isotopenverteilungen ergeben sich für Dihydroergocristin, aufgenommen in deuteriertem Methanol (Abb. 59) für $M^+ + 1$ ($\frac{m}{e}$ 270) 36,5 proz., für $M^+ + 2$ ($\frac{m}{e}$ 271) 28,5 proz. und $M^+ + 3$ ($\frac{m}{e}$ 272) 11,85 proz.. M^+ 269 zu 18,1 proz. hat nicht ausgetauscht und ein weiteres Proton zu nur 5,03 proz. spielt für diese Untersuchung keine Rolle.

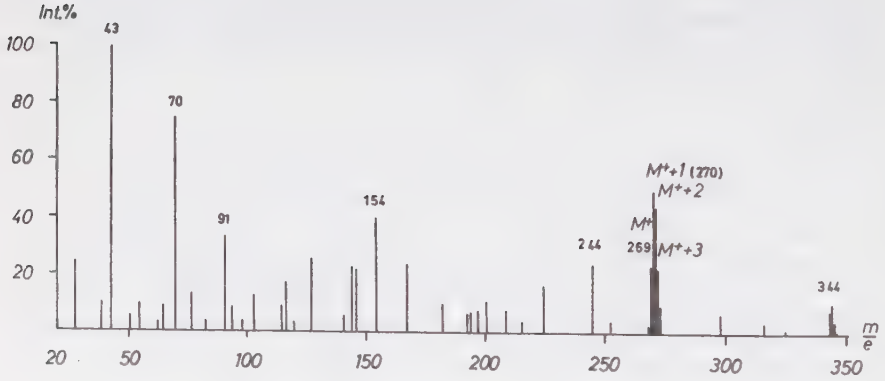


Abb. 59: Massenspektrum von Dihydroergocristin (Methanol - D_4)

Aus der Isotopenverteilung ($M^+ + 1$, $M^+ + 2$, $M^+ + 3$) ergibt sich, daß im Amidteil drei Protonen ausgetauscht worden sind, nämlich der Indol-Wasserstoff und zwei Wasserstoffatome des als primäres Amin vorliegenden thermischen Spaltproduktes der Aminogruppe in C - 8. Im Massenspektrum oder bei thermischen Spaltungen wird also durch das bewegliche Wasserstoffatom der tertiären OH-Gruppe in C - 12' der Amidteil als Dihydrolysergsäureamid vom Peptidteil abgelöst, ohne daß ein C-Atom verloren geht (Abb. 60). Für Dihydrolysergsäureamid ist M^+ 269 und für den

Peptidteil M^+ 342 charakteristisch. Dies ist für die analytischen Untersuchungen an Mutterkornalkaloiden von besonderem Interesse. Wenn einer der beiden charakteristischen Peaks im Massenspektrum fehlt, läßt sich aussagen, ob der Amidteil oder der Peptidteil in seiner Struktur verändert worden ist.

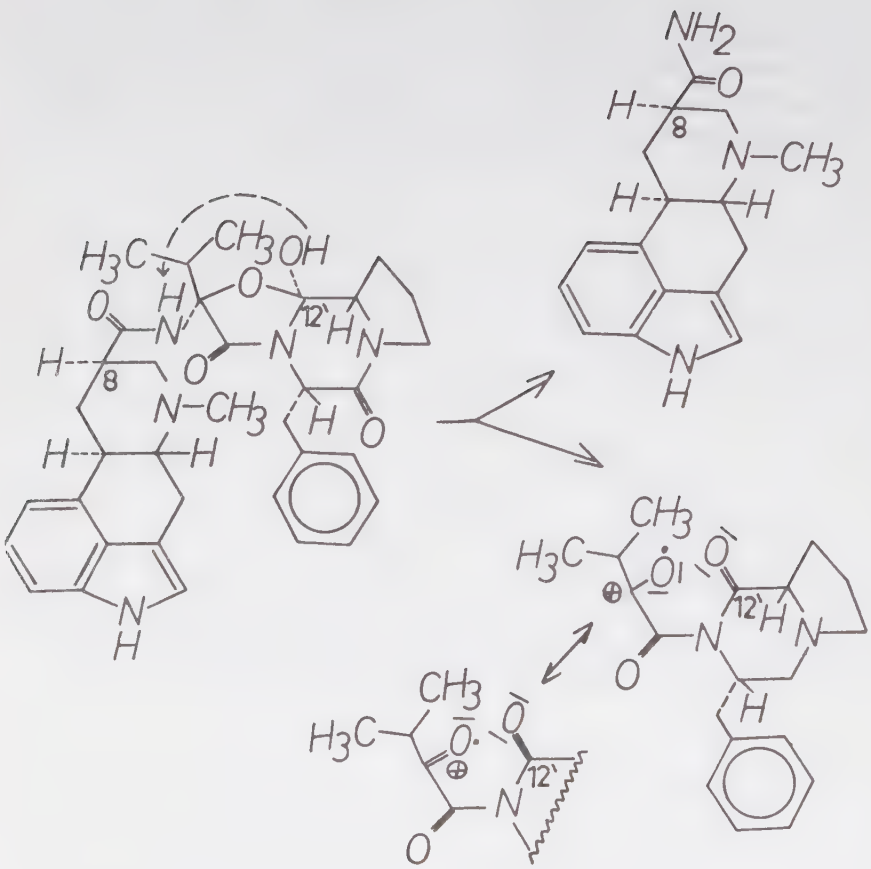
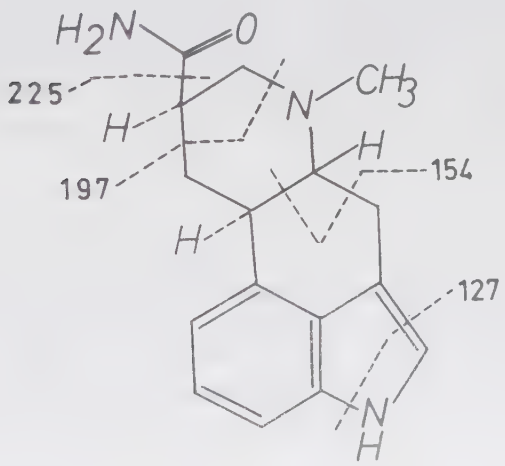


Abb. 60: Thermische Spaltung des Dihydroergocristins in Dihydrolysergsäureamid und Peptidteil durch Protonenwanderung von der tertiären Hydroxylgruppe in C -12' zum sekundären Stickstoff in C - 8.

Der Molekülpeak des Zersetzungsproduktes Z_1 (Abb. 56) M^+ von 270 ME entspricht dem Molekulargewicht der Dihydrolysergsäure.

Das Massenspektrum des Zersetzungsproduktes Z_2 weist einen Molekülpeak M^+ von 269 ME (Abb. 57) auf. Er entspricht dem Molekulargewicht des Dihydrolysergsäureamids.



Fragmentierung des Dihydrolysergsäureamids im Massenspektrum:

Dihydrolysergsäureamid

$C_{16}H_{19}N_3O$

Fragmentierung:

$C_{16}H_{19}N_3O$	-	CH_2NO	=	225
$C_{15}H_{17}N_2$	-	C_2H_4	=	197
$C_{13}H_{13}N_2$	-	C_2H_5N	=	154
$C_{11}H_8N$	-	CHN	=	127

Restalkaloid A

Das nach dem Erhitzen unzersetzt gebliebene Restalkaloid wurde ebenfalls spektroskopisch untersucht und Spektren mit denen von Ergocristin und Ergokryptin verglichen.

Die IR-Spektren sind besonders wichtig zur Unterscheidung der Normal- (Substituent am C - 8 äquatorial) von den Iso-Alkaloiden (Substituent am C - 8 axial) für den Bereich 1600 - 1800 cm^{-1} [19]. Die Lagen der Carbonylfunktionen der Carbamidbindung am C - 8, der Ketofunktion C - 3', des γ-Lactonringes, sowie die Carbonylbande des Lactams am C - 6' befinden sich in diesem Bereich.

Bei Dihydroergocristin (Abb. 61), Ergocristin (Abb. 62) und Ergokryptin (Abb. 63) befindet sich die Bande der Ketogruppe am C - 3' des γ-Lactonringes im Peptidring zwischen 1715 cm^{-1} und 1730 cm^{-1}. Die Aufspaltung allerdings ist ein Zeichen dafür, ob eine Δ C - 9 / C - 10 hydrierte Verbindung (s. Abb. 61, 1710 - 1720 cm^{-1} und Ergocristin Abb. 62, 1720 cm^{-1}) vorliegt, oder ob als variable Aminosäure Phenylalanin oder, wie bei Ergokryptin (Abb. 63, 1720 cm^{-1}), Leucin eingebaut ist.

Die Aufspaltung der Carbonylgruppe der Carbamidbindung am C - 8 mit der Carbonylgruppe der Lactambindung des Peptidringes am C - 6' ist bei Dihydroergocristin (1640 cm^{-1} u. 1670 cm^{-1}) und bei Ergokryptin (1620 cm^{-1} u. 1650 cm^{-1}) deutlich zu erkennen.

---

19) A. Hofmann, Die Mutterkornalkaloide, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1964, S. 118.

Charakteristisch für Dihydroergocristin ist die starke Wasserstoffbrückenbindung zwischen 3000 cm^{-1} und 3400 cm^{-1}. Obwohl sich im allgemeinen CH-Bindungen an Wasserstoffbrückenbindungen nicht beteiligen, ist dies ein Hinweis auf ein hydriertes Alkaloid wie Dihydroergocristin (Abb. 61). In den Vergleichsspektren des Ergocristins und des Ergokryptins erkennt man bei 3310 cm^{-1} bzw. 3240 cm^{-1} (Abb. 62 u. Abb. 63) die scharfe Bande des Indolstickstoffs im Lysergsäureteil.

Der untere Bereich der Spektren von 1100 - 700 cm^{-1} ist bei Ergocristin und Dihydroergocristin bis auf wenige Unterschiede sehr ähnlich. Charakteristisch für Ergokryptin ist das Dublett bei 770 cm^{-1} und 740 cm^{-1}, während bei Dihydroergocristin und Ergocristin in diesem Bereich die Wagging-Schwingungen des Phenylringes, des Phenylalanins im Peptidring Banden anderer Intensitäten ergeben.

Die charakteristischen Schwingungen der IR-Spektren zur Unterscheidung ungesättigter und aromatischer CH-Valenz-Schwingungen um 3000 cm^{-1} ist bei diesen großen Molekülen zur Erkennung der olefinischen von der gesättigten Bindung C - 9 / C - 10 aufgrund der Größe der Moleküle nicht geeignet.

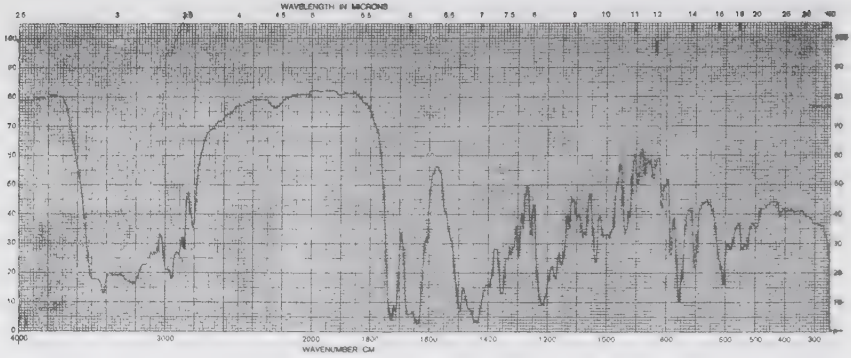


Abb. 61: IR-Spektrum von Dihydroergocristin (KBr)

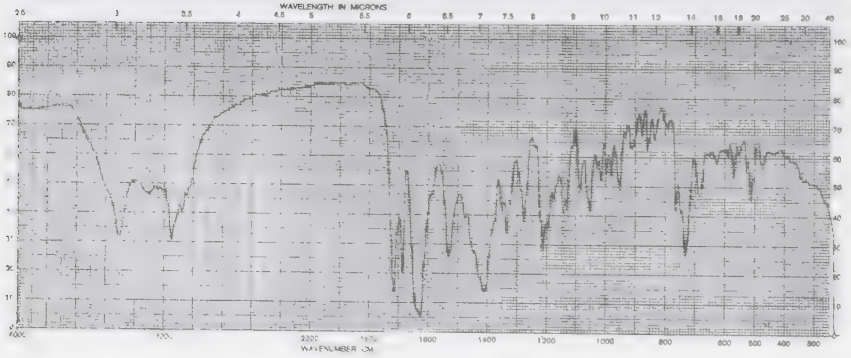


Abb. 62: IR-Spektrum von Ergocristin (KBr)

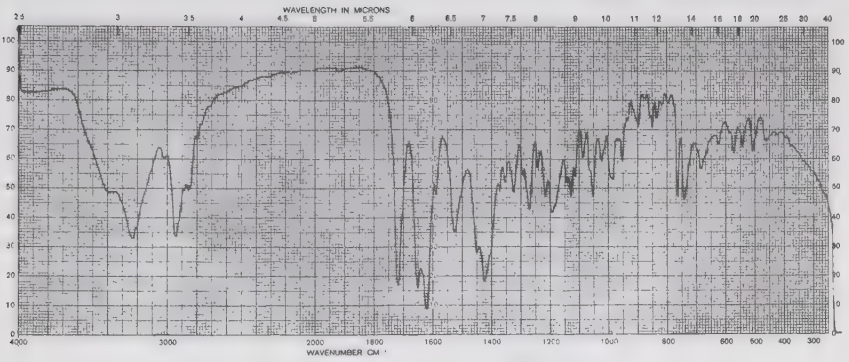
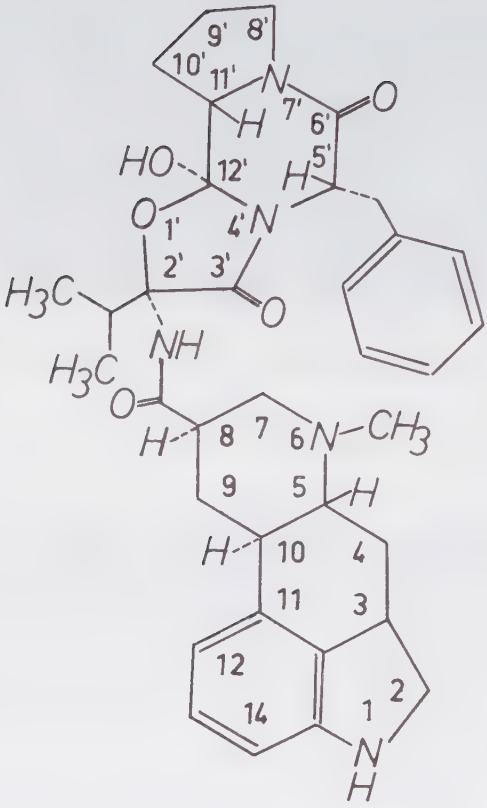


Abb. 63: IR-Spektrum von Ergokryptin (KBr)

In den NMR-Spektren assoziieren die Banden aufgrund der zahlreichen Protonen stark, daher können wie beim Dihydrolysergsäure-Amid nur die ppm-Bereiche angegeben werden.



Strukturformel von Dihydroergocristin.

Zum besseren Verständnis werden außer der Strukturformel des Dihydroergocristins auch die Dreidingmodelle des Dihydrolysergsäure-Amids (Abb. 64), des Lysergsäureamids (Abb. 65) und des Peptidringes des Dihydroergocristins (Abb. 66) aufgezeichnet.

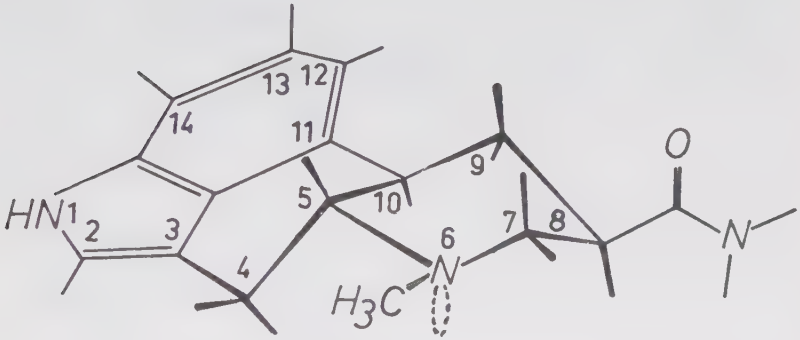


Abb. 64: Dihydrolysergsäureamid

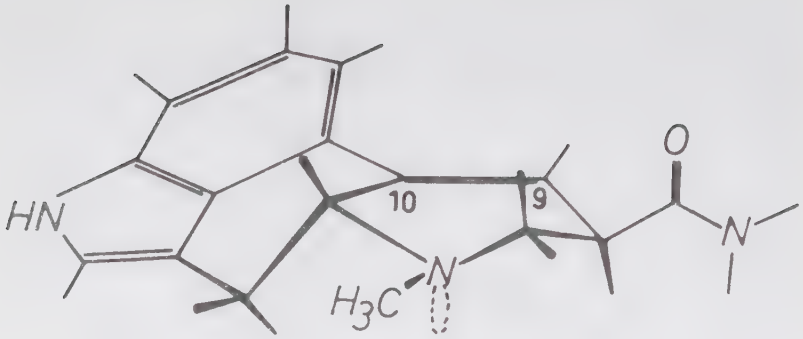


Abb. 65: Lysergsäureamid

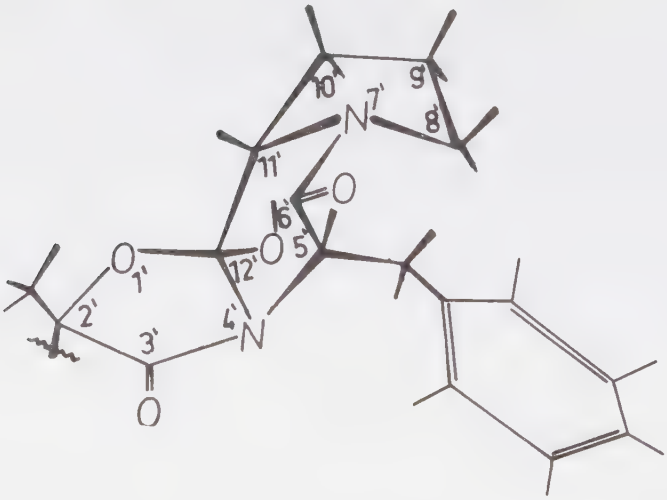


Abb. 66: Peptidring des Dihydroergocristins

Die aromatischen Protonen des Dihydroergocristins (Abb. 64 u. Abb. 67) H_2, H_{12}, H_{13}, H_{14} und des Phenylringes des Phenylalanins im Peptidring (Abb. 66 u. Abb. 67) liegen im Bereich δ = 6,7 - 7,5 ppm.

Die aliphatischen Protonen außer der Isopropylgruppe in C_2, überlappen im Bereich δ = 1,5 - 4 ppm. Auffällig ist das scharfe Signal bei δ = 2,2 ppm, das im NMR-Spektrum des Dihydrolysergsäureamids (Abb. 55) fehlt, also von Protonen gleicher Umgebung des Peptidteils stammt. Die aliphatischen Protonen der Isopropylkette in C_2, des Peptidteils werden durch die Signale δ = 0,6 - 1,3 ppm angezeigt (Abb. 67).

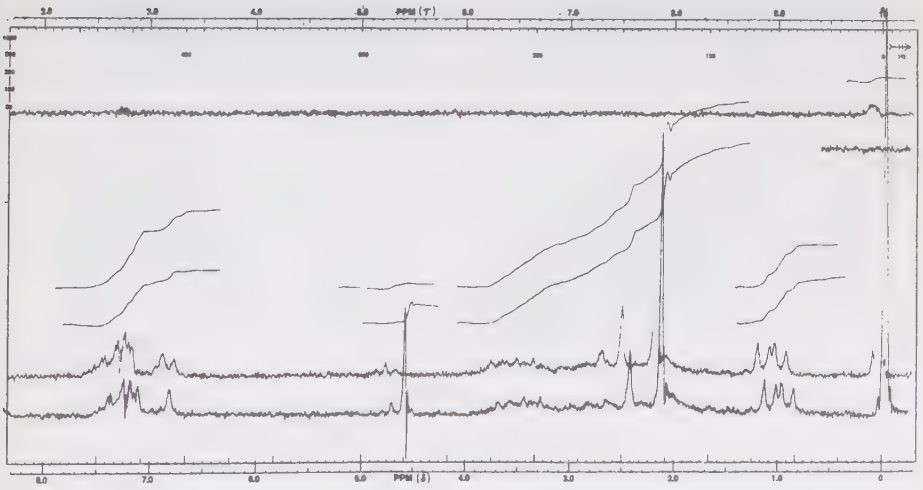


Abb. 67: NMR-Spektrum des Dihydroergocristins (Chloroform-D)

Zersetzungsprodukt Z_3

Aufgrund der gleichen Rf-Werte der Zersetzungsprodukte (Bez. Z_3) von Dihydroergocristin und Dihydrolysergsäure in Methanol nach dem Erhitzen in verschiedenen chromatographischen Systemen (vergl. Abb. 49 u. Abb. 50, S.102), konnte nur ein Abbauprodukt der Dihydrolysergsäure entstanden sein oder ein Reaktionsprodukt mit dem Lösungsmittel. Der Peptidteil war jedenfalls abgespalten.

Nach der präparativen Aufarbeitung mit Ameisensäuremethylester 40, Butanol 40 und verd. Essigsäure 20 und einem weiteren Reinigunsschritt mit Diäthylamin 60 und n-Heptan 40 auf Kieselgel-DC-Platten wurde ein schwach hellgelb gefärbtes Pulver erhalten.

Das UV-Maximum bei 280 nm (5257) und das Minimum bei 245 nm (1877) zeigen, daß der Chromophor des Dihydrolysergsäuremoleküls vorliegt (Dihydrolysergsäure: Maximum 280 nm, Minimum 245 nm).

Die IR-Spektren beider Zersetzungsprodukte sind identisch. Sie zeigen im Bereich der Lacton-Lactam-Gruppierung und Carbamidgruppe des Dihydroergocristins (Abb. 68) 1600 - 1750 cm^{-1} eine Absorptionsbande bei 1720 cm^{-1} (Abb. 69). Das bestätigt die Vermutung, daß der Peptidring vom Alkaloid abgespalten ist und hier gleiche Zersetzungsprodukte vorliegen. Da sich in dem Dihydrolysergsäuremolekül nur in C - 8 eine Carboxylgruppe befindet, die bei 1600 cm^{-1} (Abb. 70) absorbiert (COO^-), und die Bande für die CO-Gruppierung der Carbamidfunktion des Lysergids (Abb. 71) bei 1630 cm^{-1} liegt, kann es sich bei dem Zersetzungsprodukt Z_3 nur um die Carbonyl-Absorption einer Estergruppierung handeln.

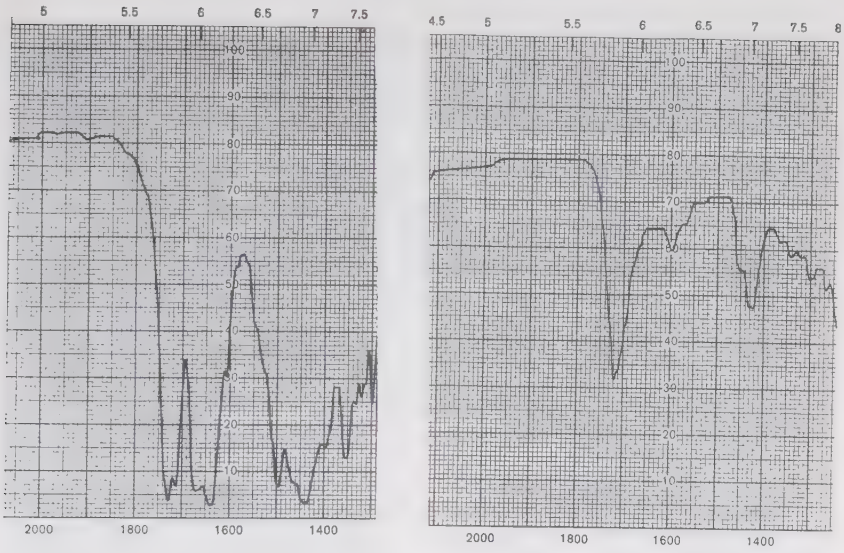


Abb. 68: IR-Spektrum des Dihydroergocristins (KBr)

Abb. 69: IR-Spektrum der Zersetzungsprod. Z_3 aus Dihydroergocristin und Dihydrolysergsäure; identische Absorptionen (KBr).

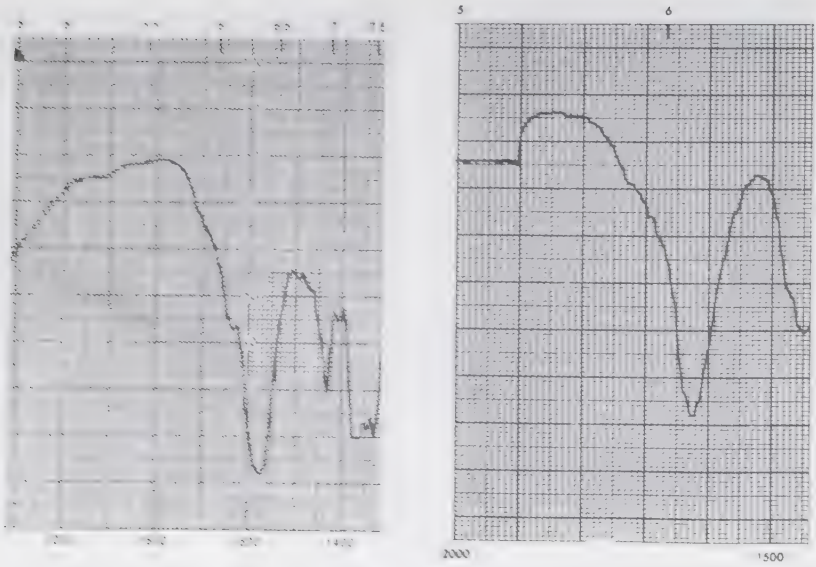


Abb. 70: IR-Spektrum der Dihydrolysergsäure (KBr).

Abb. 71: IR-Spektrum des Lysergids (KBr).

Die Vermutung, daß durch die Hitze in Methanol Dihydrolysergsäure als Vergleichssubstanz und nach der Spaltung des Peptidalkaloids mit dem Lösungsmittel zum Methylester reagiert, bestätigen die Massenspektren (Abb. 72 u. Abb. 73). Der Molekülpeak bei M⁺ 354 und die charakteristische Abspaltung von M - CH_3 ($\frac{m}{e}$ = 268) und M - CO_2CH_3 ($\frac{m}{e}$ = 253) zeigen das Spektrum des Methylesters der Dihydrolysergsäure (die weitere Fragmentierung s. S. 111).

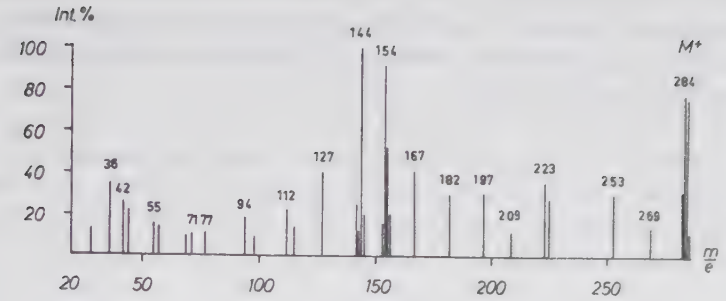


Abb. 72: Massenspektrum des Methylesters der Dihydrolysergsäure

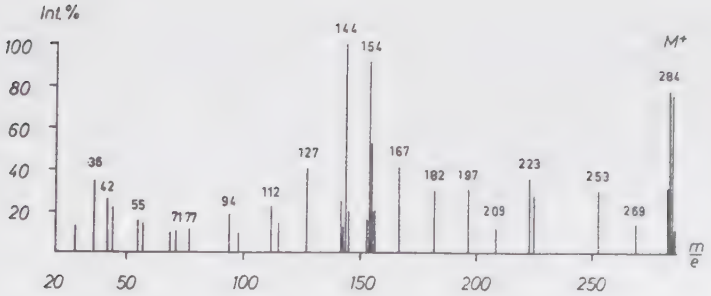


Abb. 73: Massenspektrum des Methylesters der Dihydrolysergsäure nach Spaltung des Dihydroergocristins als Reaktionsprodukt mit dem Lösungsmittel Methanol.

Die Belastungsversuche an Dihydroergocristin in Methanol und Dihydroergotoxinmethansulfonat in Wasser zeigen, daß das Peptidalkaloid zwar in die Dihydrolysergsäure und das Dihydrolysergsäureamid und den Peptidteil gespalten wird, daß aber das hydrierte Chinolinsystem und der Indolkörper zusammen im Ergolinkörper stabil bleiben.

Bei saurem pH-Wert (ca. pH 6) einer wässrigen Lösung der Alkaloidsalze läßt sich der Ester nach Zusatz von Methanol oder Äthanol nicht mehr nachweisen.

Analyse der Hydergin^{R}-Tropfen.

Die relativ große Stabilität der Hydergin^{R}-Lösung, selbst nach Verdünnen mit Wasser, ist auf Zusätze in der Originallösung zurückzuführen. Die Hydergin^{R}-Tropfen, die die gleiche erhöhte Stabilität wie die Ampullenlösungen gegenüber dem Erhitzen zeigten, wurden analysiert.

Laut Angaben des Herstellers * enthält die Tropfenlösung den Dihydroergotoxinmethansulfonatkomplex zu gleichen Teilen in einer Konzentration von 1 mg / 1 ml Lösungsmittel, das nicht näher angegeben ist.

Das Lösungsmittel, das bei einer Konzentration von 1 mg Alkaloid in 1 ml Lösung den pH-Wert von 4,3 aufweist, hat nach der Analyse folgende Zusammensetzung:

20 ml Lösungsmittel enthalten Wasser, Glycerin und Äthanol in einem Verhältnis 16 : 3 : 1.

Durch Zusatz von 1,52 ml 0,01 n Methansulfonsäure wird der pH-Wert auf 4,3 eingestellt; ohne Zusatz dieser Säure hat die Alkaloidlösung einen pH-Wert von 5,4. Die Lösung ist dann zu schwach sauer und die gelagerten Alkaloide fallen nach wenigen Stunden bei Raumtemperatur aus. Das Alkaloidsalz wird in 95 proz. Alkohol gelöst und dann mit Wasser und Glycerin verdünnt.

Eine weitere Vorsichtsmaßnahme des Herstellers der Hydergin^{R}-Tropfen ist das Abfüllen der Lösungen unter Ausschluß von Sauerstoff. Dafür bietet sich Argon oder Stickstoff an. Obwohl die Zersetzungsreaktionen nicht merklich vom Sauerstoffgehalt abhän-

---

* Sandoz AG, Nürnberg

gen, sollte man doch bei einem derart wichtigen Arzneistoff dafür sorgen, daß in allen abgefüllten Lösungen die gleichen Bedingungen herrschen.

Abbau stabilisierter Lösungen bei 100 °

Nach der Analyse des Hydergins^{R} wurden die Lösungsmittelkomponenten (Glycerin und Alkohol) darauf hin untersucht, wie stark sie die Stabilität der Lösungen beeinflussen.

In Meßreihen bei 100 ° wurden die Analysendaten der Hydergin^{R}-Tropfen durch einen Belastungstest mit einer Lösung gleicher Zusammensetzung verglichen und bestätigt; weiter wurde eine Zubereitung den gleichen Bedingungen unterworfen, die kein Glycerin enthielt. Damit sollte festgestellt werden, ob der Anteil von 3 T Glycerin in 16 T Wasser und 1 T Alkohol die Lösungen auffällig stabilisiert. Alle Lösungen haben einen pH-Wert von 4,3.

Die quantitative Bestimmung des unzersetzten Alkaloids, der Zersetzungsprodukte Dihydrolysergsäureamid und Dihydrolysergsäure wurde spektralphotometrisch vorgenommen. Für jedes Produkt wurden auf das gleiche Adsorbens Eichsubstanzen mit aufgetragen und über die Eichgeraden ihre Mengen abgelesen. Die erste Messung wurde nach 1 h 30', die letzte Messung nach 105 h vorgenommen.

Die gestrichelt gezeichnete Kurve im Diagramm (Abb. 74) zeigt den Anteil zersetzten Alkaloids der beiden Glycerin enthaltenden Lösungen. Der Zersetzungsprodukte nach,hauptsächlich Dihydrolysergsäureamid und Dihydrolysergsäure, handelt es sich um eine Hydrolysereaktion.

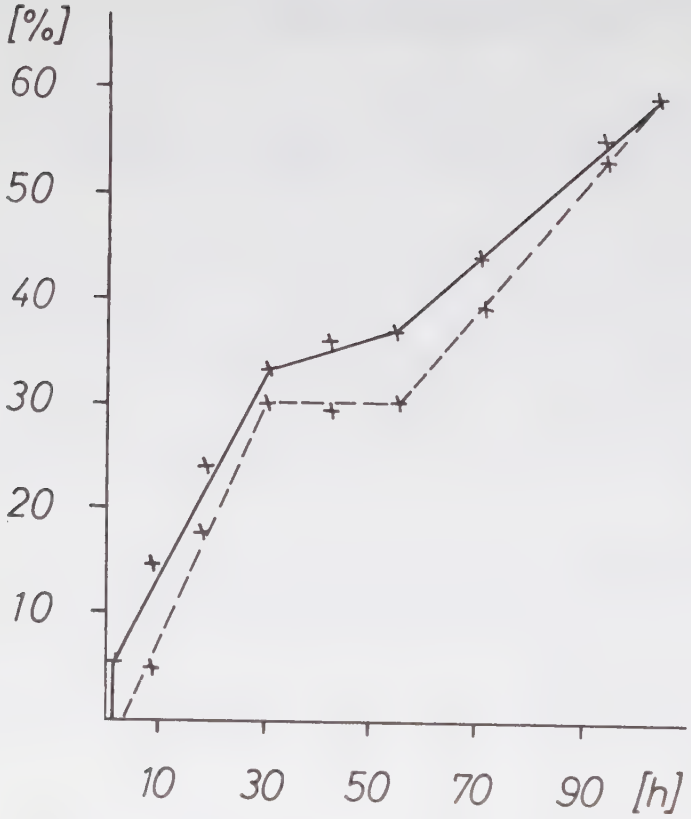


Abb. 74: Anteil an zersetztem Alkaloid bei 100 °.

(----) = Hydergin^{R}-Tropfen und Vergleichslösung gleicher Zusammensetzung;
(——) = Zubereitung ohne Glycerin.

Die Hydrolyse der glycerinfreien Lösung beginnt nach ca. 4 h mit der Bildung von Dihydrolysergsäureamid (2,5 proz.); zu dieser Zeit wurde für die glycerinhaltigen Lösungen noch kein Amid gemessen. Zu etwa gleichen Teilen bildet sich die Dihydro-

lysergsäure. Ihre Prozentangaben liegen um 1 - 1,5 proz. über dem Anteil an Dihydrolysergsäure, der sich ausschließlich infolge der Hydrolyse bei 100 ^{o} bildet; am Start des Adsorbens wird auch bei reinen, unbehandelten Alkaloiden um 1 proz. Dihydrolysergsäure gemessen.

Weitere Zersetzungsprodukte sind der abgespaltene Peptidteil, sowie Polymerisationsprodukte aufgrund des Indolcharakters der Alkaloide und zum geringen Teil (nicht messbar) die Aciform des Alkaloids. Sie bilden sich in etwa doppelter Menge wie Dihydrolysergsäure und Dihydrolysergsäureamid zusammen.

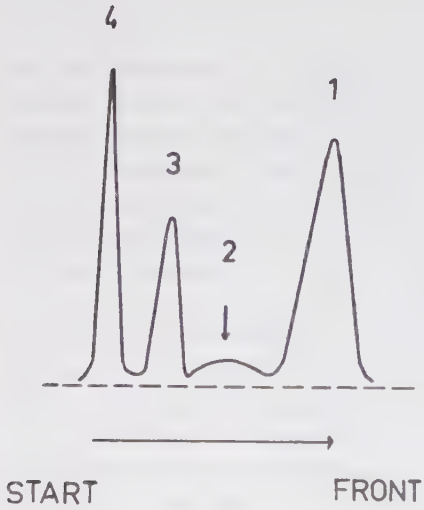


Abb. 75: Remissionsortskurve von Dihydroergotoxinmethansulfonat (1 mg / 1 ml) in Wasser - Äthanol (19 : 1) nach 105 h bei 100 ^{o}.

(1) = Alkaloidsalz, unzersetzt
(2) = Aciprodukt (Pfeil)
(3) = Dihydrolysergsäureamid
(4) = Dihydrolysergsäure

Das Diagramm (Abb. 74) zeigt, daß die Hydrolyse aufgrund des Glycerinzusatzes zeitlich verzögert eintritt (Lsg. ohne Glyce-

rin nach 4 h, Lsg. mit Glycerin ca. 6 h). Das Alkaloid ist nach 30 h zu 30 proz. hydrolysiert. Nach weiteren 30 h ändert sich das Gleichgewicht zwischen dem Peptidalkaloid und Hydrolyseprodukt in der glycerinhaltigen Lösung kaum, dann jedoch wird die Aktivierungsenergie durch das Erhitzen auf 100 ^{o} so groß, daß die stabilisierenden Eigenschaften des Glycerins merklich schwinden und nach 100 h alle Lösungen zu 60 proz. zersetzt sind.

Ein wenig unter den Anteilen der Hydrolyseprodukte (Dihydrolysergsäure und Dihydrolysergsäureamid) in den glycerinfreien Lösungen liegen die Hydrolyseprodukte in den glycerinhaltigen Zubereitungen (12,2 proz.). Nach 10 proz. Hydrolyse verzögert sich die Reaktion und wird nach 60 h wieder aktiviert.

Die Zubereitung gleicher Zusammensetzung, die Glycerin und Alkohol in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 4,3 im Verhältnis 3 : 1 : 16 enthalten, bilden qualitativ und quantitativ die gleichen Abbauprodukte. Die wässrige Lösung (Wasser 19 T, Alkohol 1 T) gleichen pH-Wertes und Alkaloidkonzentration (1 mg / 1 ml) neigt besonders im Bereich zwischen 30 und 60 h zu einer 10 - 20 proz. stärkeren Zersetzung als die glycerinhaltigen Lösungen. Jedoch ist anzunehmen, daß die Aktivierungsenergie nach 30 h Erhitzen auf 100 ^{o} über die Anforderungen der normalerweise geforderten Stabilität bei Raumtemperatur für zwei Jahre hinausgeht.

Gleiche Messungen zeigten, daß sich glycerinhaltige Zubereitungen hydrierter Mutterkornalkaloide auch nach einigen Monaten Lagerungszeit bei 45 ^{o} nicht zersetzten.

Zusammenfassung

Das Alkaloidgemisch Dihydroergotoxin ist dünnschichtchromatographisch mit einfachen Fließmittelkombinationen auf nicht imprägnierten Adsorbentien nicht in seine Einzelkomponenten Dihydroergocristin, Dihydroergokryptin und Dihydroergocornin zu trennen. Es lassen sich aber unter diesen Bedingungen die natürlichen Alkaloide von den hydrierten chromatographisch unterscheiden, wie Ergotoxin von Dihydroergotoxin, Lysergsäure von Dihydrolysergsäure und Lysergsäureamid von Dihydrolysergsäureamid. Die Isomerisierungsprodukte der natürlichen Alkaloide lassen sich auch von diesen und den Dihydroderivaten ohne größere Schwierigkeiten abtrennen.

Eine Trennung des Dihydroergotoxinkomplexes gelingt auf formamidimprägnierten Zelluloseplatten. Unter Berücksichtigung bestimmter Bedingungen, wie den aufzutragenden Mengen und der quantitativen Zusammensetzung des Alkaloidgemisches, sind die Einzelalkaloide des Dihydroergotoxinkomplexes spektralphotometrisch durch Fluoreszenzminderung quantitativ direkt auf dem Adsorbens bestimmbar. Mit dem gleichen System trennen sich die natürlichen Alkaloide des Ergotoxins von den hydrierten ab, so daß beide Substanzgruppen nebeneinander identifiziert werden können.

UV-Spektroskopisch ist es auch ohne Chromatographie möglich, den Anteil natürlicher Alkaloide in hydrierten quantitativ zu erfassen. Über die Extinktionen bei den Maxima der natürlichen und hydrierten Produkte wird in einem Diagramm direkt der Prozentgehalt abgelesen.

Extreme Belastungen hydrierter Alkaloidbasen und ihrer Salze führen je nach Lösungsmittel zu mehr oder weniger starken Verschiebungen der Maxima in den UV-Spektren. Chromatographisch lassen sich die entstandenen Zersetzungsprodukte abtrennen. Die unzersetzt gebliebenen Alkaloide wurden auf dem Adsorbens direkt quantitativ durch Fluoreszenzminderung bestimmt. Die wässrigen

Lösungen der Alkaloidsalze sind gegenüber dem Erhitzen und der Lichteinwirkung labiler als die methanolischen Lösungen der Basen.

Die Zersetzungsprodukte, die durch Hitze und Licht entstanden, wurden präparativ aufgearbeitet. Auch nach wochenlangem Erhitzen wässriger Lösungen der hydrierten Alkaloidsalze bei 100 ° entstehen vorwiegend Dihydrolysergsäureamid und Dihydrolysergsäure, während die Aciform des Alkaloids erst chromatographisch nachgewiesen werden kann, wenn das Alkaloid bereits zu mehr als 50 proz. hydrolysiert ist. Die Zersetzungsprodukte Dihydrolysergsäure und Dihydrolysergsäureamid lassen sich im gleichen System mit dem unzersetzten Alkaloid direkt auf der DC-Platte quantitativ bestimmen. In methanolischen- oder äthanolischen Lösungen reagiert die Dihydrolysergsäure mit den Lösungsmitteln zu den entsprechenden Estern. Alle Produkte zeigen nach dem Erhitzen eine positive van Urk-Reaktion.

Längere Belichtung schwach saurer, wässriger Lösungen der hydrierten Alkaloidsalze führt zum Ausfall der van Urk-Reaktion. Nach der chromatographischen Trennung aus äthanolischer Lösung wurde ein Produkt isoliert, an dessen α-Stellung im Indolsystem eine Aethoxygruppe substituiert ist.

Die Analyse der handelsüblichen Hydergin^{R}-Tropfenlösung zeigte, daß Zusatz von Glycerin zur Stabilisierung und Äthanol zur Löslichkeit, sowie ein pH von 4,3 und Lichtschutz die Zersetzungsreaktionen auch bei der Temperatur von 100 ° verzögern. Bei normaler Lagertemperatur ist in so zubereiteten Lösungen eine Haltbarkeit gegeben, die den üblichen Stabilitätsforderungen entspricht.

Beschreibung der Versuche

Elektronenspektren

Die Messungen wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ III und einem Beckmann DBGT -Spektralphotometer in Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke durchgeführt.

Infrarot-Absorptionsspektren

Die Spektren wurden in einem Beckmann Spektralphotometer 20 A - X aufgenommen.

Kernresonanzspektren

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte in einem Varian A-60-Gerät, als Referenzsignal diente Tetramethylsilan.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden in einem Gerät der Bezeichnung Gas Chromatograph, Mass-Spektrometer, Type 9000 (Fa. LKB) und AEJ, MS 9 aufgenommen.

Ionenquelle : 250 °
Beschleunigungsspannung: 3,5 KV
Ionisierungsenergie: 70 eV

Van Urk-Reagens

Zur Herstellung des van Urk-Reagenzes für die Detektion der Mutterkornalkaloide direkt auf dem Adsorbens wurden 0,5 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml Cyclohexan auf dem Wasserbad unter Wärmeentwicklung gelöst.

Zum Nachweis der Mutterkornalkaloide in Lösungen wurden 0,5 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in eine gekühlte Mischung von 65 ml Schwefelsäure und 35 ml Wasser, der 0,1 ml einer 5 proz. $FeCl_3$-Lösung zugesetzt wurde, gelöst.

Dünnschichtchromatographie

Chromatographiert wurde, falls das Adsorbens nicht angegeben ist, auf DC-Kieselgelfertigplatten F_{254} (Merck).

Die Laufhöhe betrug 10 cm.

Für die Trennung des Dihydroergotoxinkomplexes und dessen quantitative Bestimmung wurden Zelluloseplatten F_{254} (Merck) verwendet.

Die Alkaloidlösungen wurden mit einer Hamilton-Spritze in einer Menge von 1 - 2 γ aufgetragen, wobei der Durchmesser der Flecke 2 mm nicht überschritt.

Die Zelluloseplatten wurden durch Tauchen in eine Lösung aus Formamid (p. A.) (Merck) in Aceton (15 proz. v / v) imprägniert. Das Lösungsmittel wurde durch Kaltluft von 5 Min. und anschließendem Aktivieren im Trockenschrank bei 100 ^{o} für 90 Sek. entfernt. Die Laufhöhe betrug 15 cm und die Laufzeit 45 Min.

Verfärbungen einiger Alkaloidlösungen in Hitze und Licht.

Als Lösungsmittel wurde bidestilliertes Wasser oder Methanol für die Spektroskopie (Uvasol, Merck) verwendet. Die Lösungen wurden dem Sonnenlicht in Ampullen aus weißem Glas, dem UV-Licht in Quarzbehältnissen und der Hitze in Ampullen aus braunem Glas ausgesetzt.

Lösungen folgender Konzentrationen wurden verwendet:

Dihydroergocristin, methanolisch,
0,45 mg, 3 mg oder 20 mg / 10 ml;
Ergocristin, methanolisch,
0,45 mg, 3 mg oder 20 mg / 10 ml;
Dihydroergotoxinmethansulfonat, wässrig,
0,45 mg, 3 mg oder 20 mg / 10 ml;
Hydergin^{R}-Ampullen (mit Wasser auf den Gehalt eingestellt), wässrig,
0,45 mg oder 3 mg / 10 ml.

Alle zur Chromatographie verwendeten Lösungen hatten die gleiche Konzentration (3 mg / 10 ml). Die UV-Spektren der einzelnen Alkaloide wurden zur Bestimmung der Hauptmaxima in den entsprechenden methanolischen und wässrigen Lösungen der Konzentration 4,5 mg / 100 ml aufgenommen.

Sonnenlicht	Dihydroergocristin methanol. Lsg.	Ergocristin methanol. Lsg.	Dihydroergotoxin-methansulfonat wässrige Lsg.	Hydergin^{R}-Ampullen wässrige Lsg.
24 h 4,5 mg / 100 ml	farblos	gelb	farblos	farblos
3,0 mg / 10 ml	farblos	braun	hellgelb	hellgelb
20 mg / 10 ml	gelb	dunkelgrün	gelb - braun	---
48 h 4,5 mg / 100 ml	farblos	gelb	farblos	farblos
3,0 mg / 10 ml	hellgelb	braun	gelb	gelb
20 mg / 10 ml	gelb - grün	braun - grün	gelb - braun	---
96 h 4,5 mg / 100 ml	hellgelb	hellbraun	gelbstichig	gelbstichig
3,0 mg / 10 ml	gelb	braun	gelb	braun - gelb, flockiger Niederschlag
20 mg / 10 ml	hellbraun	braun - grün	grün, flockiger Niederschlag	---

Hitze (Temp. 100°)		Dihydroergocristin methanol. Lsg.	Ergocristin methanol. Lsg.	Dihydroergotoxin-methansulfonat wässrige Lsg.	Hydergin^{R}-Ampullen wässrige Lsg.
24 h	4,5 mg / 100 ml	farblos	farblos	farblos	farblos
	3,0 mg / 10 ml	farblos	braun	farblos	farblos
	20 mg / 10 ml	gelb	grün	hellgelb	----
48 h	4,5 mg / 100 ml	farblos	gelb	farblos	farblos
	3,0 mg / 10 ml	farblos	braun	farblos	farblos
	20 mg / 10 ml	gelb	grün	gelb	----
96 h	4,5 mg / 100 ml	farblos	hellgrün	gelb	gelbstichig
	3,0 mg / 10 ml	farblos	grün	gelbstichig	gelbstichig
	20 mg / 10 ml	gelb	dunkelgrün, flockiger Niederschlag	braun - gelb	----

Verfärbungen der Alkaloidlösungen durch UV-Bestrahlung bei 254 nm.

UV 254 nm	Dihydroergocristin methanol. Lsg.	Ergocristin methanol.Lsg.	Dihydroergotoxinmethansulfonat wässrige Lsg.
24 h 4,5mg / 100ml	hell-gelb	gelbe Fluoreszenz	hell-gelb
10mg / 10ml	hell-gelb	grün	hell-gelb
48 h 4,5mg / 100ml	hell-gelbe Fluoreszenz	gelbe Fluoreszenz	hell-gelbe Fluoreszenz
10mg / 10ml	hell-gelbe Fluoreszenz	tief-grün	hell-gelbe Fluoreszenz
96 h 4,5mg / 100ml	gelbe Fluoreszenz	gelbe Fluoreszenz	gelbe Fluoreszenz
10mg / 10ml	gelb-grüne Fluoreszenz	braun-grün	gelb-grüne Fluoreszenz

Meßergebnisse der quantitativen Trennung des Dihydroergotoxins bei 285 nm und 560 nm.

Zu jeder Meßreihe gehören die Flächenwerte der Eichsubstanz Dihydroergocristin sowie die der Alkaloide des Dihydroergotoxinkomplexes. Den aufgetragenen γ-Mengen sind die Flächenwerte in mm^2 zugeordnet. Die Eichsubstanz Dihydroergocristin wurde von 0,5 - 3γ bzw. 0,3 - 1,6γ aufgetragen. Die Flächenwerte des getrennten Alkaloidkomplexes Dihydroergotoxin sind Mittelwerte aus je vier Messungen auf dem gleichen Adsorbens (Zellulose F_{254}, Merck). Als Fließmittel diente n-Heptan 65, Essigsäureäthylester 30 und Diäthylamin 5. Die Platten wurden imprägniert durch Eintauchen in eine Lösung aus Formamid-Aceton (15 proz. v / v). Anschließend wurden die feuchten Platten kalt gefönt und 90 Sek. im Trockenschrank bei 100 ^{o} aktiviert. Die Laufzeit des Fließmittels beträgt 45 Min.

Meßreihen bei 285 nm:

Dihydroergocristin (aufgetragen in γ):	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Flächen für die Eichkurve:	114,7mm^2	144,0mm^2	162,5mm^2	206,2mm^2	252,0mm^2	286,0mm^2

Dihydroergotoxin (aufgetragen in γ):	1,0	2,0
Fläche des Dihydroergokryptins:	44,0mm^2	58,7mm^2
Fläche des Dihydroergocornins:	46,7mm^2	80,2mm^2
Fläche des Dihydroergocristins:	44,0mm^2	86,6mm^2
Gesamtfläche von Dihydroergotoxin:	134,7mm^2	225,5mm^2

Meßreihen bei 285 nm

Dihydroergocristin (aufgetragen in γ):	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Flächen für die Eichkurve:	70,5mm^2	140,3mm^2	169,0mm^2	224,0mm^2	234,0mm^2	270,0mm^2

Dihydroergotoxin (aufgetragen in γ):	1,0	2,0
Fläche des Dihydroergokryptins:	46,0mm^2	51,2mm^2
Fläche des Dihydroergocornins:	52,0mm^2	82,6mm^2
Fläche des Dihydroergocristins:	48,0mm^2	82,2mm^2
Gesamtfläche von Dihydroergotoxin:	146,0mm^2	216,4mm^2

Meßreihen bei 560 nm

Dihydroergocristin (aufgetragen in γ):	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Flächen für die Eichkurve:	263,5mm^2	288,0mm^2	328,1mm^2	429,0mm^2	502,0mm^2	555,5mm^2

Dihydroergotoxin (aufgetragen in γ):	1,0	2,0
Fläche des Dihydroergokryptins:	98,0mm^2	147,0mm^2
Fläche des Dihydroergocornins:	172,0mm^2	242,2mm^2
Fläche des Dihydroergocristins:	220,5mm^2	247,5mm^2
Gesamtfläche von Dihydroergotoxin:	490,5mm^2	636,7mm^2

Meßreihen bei 560 nm

Dihydroergocristin (aufgetragen in γ):	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Flächen für die Eichkurve:	162,3mm^2	201,0mm^2	249,8mm^2	293,6mm^2	392,0mm^2	454,5mm^2

Dihydroergotoxin (aufgetragen in γ):	1,0	2,0
Fläche des Dihydroergokryptins:	67,4mm^2	76,9mm^2
Fläche des Dihydroergocornins:	110,2mm^2	154,5mm^2
Fläche des Dihydroergocristins:	120,7mm^2	166,4mm^2
Gesamtfläche von Dihydroergotoxin:	298,3mm^2	397,8mm^2

Meßreihen bei 285 nm

Dihydroergocristin (aufgetragen in γ):	0,3	0,4	0,5	0,7	0,8	1,0	1,3	1,6
Flächen für die Eichkurve:	19,3mm^2	28,0mm^2	36,0mm^2	44,0mm^2	58,0mm^2	65,6mm^2	84,5mm^2	100,7mm^2

Dihydroergotoxin (aufgetragen in γ):	1,6
Fläche des Dihydroergokryptins:	38,0mm^2
Fläche des Dihydroergocornins:	40,0mm^2
Fläche des Dihydroergocristins:	41,0mm^2
Gesamtfläche von Dihydroergotoxin:	119,0mm^2

Maxima und Minima der Lösungen von Dihydroergocristin und Ergocristin und ihrer Mischungen.

Die Extinktionen werden in Klammern hinter die Zahlen für die Wellenlänge angegeben.

1.) Werte der Lösungen von Dihydroergocristin oder Ergocristin:

Dihydroergocristin:	9 mg in 100 ml Methanol
Hauptmaximum:	281 nm (0,98)
Nebenmaximum:	292 nm (0,81)
Minimum:	246 nm (0,27)
Ergocristin:	9 mg in 100 ml Methanol
Maximum:	312 nm (1,26)
Minimum:	271 nm (0,28)

2.) Werte der Mischungen aus Dihydroergocristin und Ergocristin in Methanol:

Mischungen:	
Dihydroergocristin /	Ergocristin 50 : 50
4,5 mg	4,5 mg
Maximum:	292 - 93 nm (0,84)
Minimum:	267 nm (0,53)
Dihydroergocristin /	Ergocristin 90 : 10
8,1 mg	0,9 mg
Hauptmaximum:	281 - 82 nm (0,95)
Nebenmaximum:	292 nm (0,83)
Minimum:	250 - 52 nm (0,50)

Dihydroergocristin	/ Ergocristin 96 : 4	
8,64 mg	0,36 mg	
Hauptmaximum:	281 nm	(0,99)
Nebenmaximum:	292 nm	(0,83)
Minimum:	247 nm	(0,39)

Maxima und Minima der Alkaloide Ergocristin, Dihydroergocristin, Dihydroergokryptin, Dihydroergotoxin, Hydergin^{R}-Ampullen und Dihydroergotoxinmethansulfonat.

Ergocristin:	4,25 mg / 100 ml Methanol	
Maximum:	312 nm	(0,62)
Minimum:	270 nm	(0,16)
Nebenmaximum:		
Verdünnung 1 / 10	(202 nm	(0,38))
Dihydroergocristin:	4,5 mg / 100 ml Methanol	
Maximum:	281 nm	(0,48)
Minimum:	246 nm	(0,13)
Nebenmaximum:	291 nm	(0,39)
Verdünnung 1 / 10	222 nm	(0,30)
Dihydroergokryptin:	4,25 mg / 100 ml Methanol	
Maximum:	281 nm	(0,42)
Minimum:	246 nm	(0,18)
Nebenmaximum:	292 nm	(0,35)
	223 nm	(1,76)
	(210 nm	(1,67))
Nebenminimum:	(215 nm	(1,64))

Dihydroergotoxin:	4,5 mg / 100 ml Methanol
Maximum:	281 nm (0,43)
Minimum:	246 nm (0,18)
Nebenmaximum:	292 nm (0,37)
	221 nm (1,77)
Hydergin^{R}-Ampullen:	4,5 mg / 100 ml H_2O
Maximum:	280 nm (0,41)
Nebenmaximum:	220 nm (0,39)
Minimum:	245 nm (0,12)
Dihydroergotoxin-methansulfonat:	4,5 mg / 100 ml H_2O
Maximum:	280 nm (0,41)
Nebenmaximum:	220 nm (0,39)
Minimum:	245 nm (0,13)

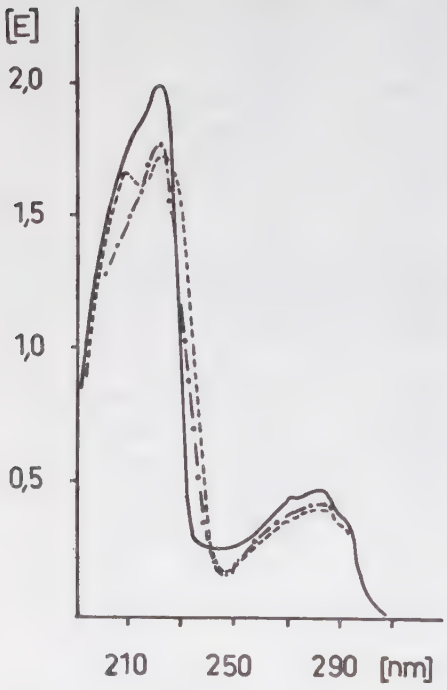


Abb. 76: UV-Absorptionsspektrum von Dihydroergocristin 4,5 mg / 100 ml Methanol (——), Dihydroergokryptin 4,25 mg / 100 ml Methanol (— —) und Dihydroergotoxin (Dihydroergocristin, Dihydroergokryptin und Dihydroergocornin zu gleichen Teilen) 4,5 mg / 100 ml Methanol (-·-·-).

Der Unterschied der Spektren von Dihydroergokryptin und Dihydroergocristin besteht lediglich in einem Nebenmaximum von 210 nm bei Dihydroergokryptin. Im Gemisch Dihydroergotoxin liegt in diesem Bereich nur ein Maximum von 221 nm vor (Abb. 76).

Konzentrationen der Lösungen für die UV-Spektren nach der Sonnenlichtbehandlung und dem Erhitzen von 100 °C nach 96 h.

Ergocristin, Dihydroergocristin in methanolischer Lösung 4,5 mg / 100 ml.

Dihydroergotoxinmethansulfonat, Hydergin^{R}-Ampullen in wässriger Lösung 4,5 mg / 100 ml.

Maxima und Minima der Alkaloidlösungen nach der Lichtbestrahlung und dem Erhitzen von 100 ° nach 96 h.

1.) Methanolische Lösungen:

a) Ergocristin

nach der UV-Lichtbestrahlung		205 nm (1,45)
nach der Sonnenlichtbestrahlung		205 nm (1,75)
nach dem Erhitzen auf 100 °	Maxima	310 nm (0,75)
		244 nm (1,68)
	Minima	290 nm (0,71)
		236 nm (1,62)

b) Dihydroergocristin

nach der UV-Lichtbestrahlung	Maximum	260 nm (0,75)
	Minimum	252 nm (0,71)
nach der Sonnenlichtbestrahlung	Maximum	270 nm (0,63)
	Minimum	250 nm (0,44)
nach dem Erhitzen auf 100 °	Maximum	280 nm (0,57)
	Minimum	245 nm (0,22)

2.) Wässrige Lösungen:

a) Dihydroergotoxinmethansulfonat

nach der Sonnenlichtbehandlung	Maximum	265 nm (0,42)
	Minimum	255 nm (0,4)
nach dem Erhitzen auf 100 °	Maximum	256 nm (0,54)
	Minimum	247 nm (0,53)

b) Hydergin^{R}

nach der Sonnenlichtbestrahlung	Maximum	267 nm (0,4)
	Minimum	250 nm (0,33)
nach dem Erhitzen auf 100 °	Maximum	269 nm (0,46)
	Minimum	247 nm (0,4)

Spektralphotometrische Bestimmungen.

Die quantitativen Bestimmungen der Alkaloide direkt auf dem Adsorbens wurden mit einem Spektralphotometer der Bezeichnung PMQ II (Zeiss) vorgenommen. Es handelt sich um eine Absorptionsmessung in Remission der Geräteanordnung M-Pr. Die Geschwindigkeit des Kreuztisches betrug 30 inch. / Min. und die Spaltbreite 0,8. Für die Eichkurven wurden 0,3 γ bis 2,4 γ der Vergleichssubstanz aufgetragen.

Berechnung der Flächen der Remissionsortskurven.

Die Flächen der Kurven des Schreibers (Integratur Vitatron) wurden aus dem Produkt der Halbwertsbreite B_h und der Differenz zwischen dem Extremwert $R_{min, rel.}$ des Remissionsgrades der Probe und dem Remissionsgrad des Untergrundes $R_{u, rel.}$ ermittelt und in mm^2 angegeben.

Vergleich des Dihydroergotoxinmethansulfonats mit dem Hydergin^R-Wirkstoff.

1.) UV-Absorptionsspektrum: Die Probe Dihydroergotoxinmethansulfonat wurde zu 3 mg in 100 ml Wasser gelöst, und die Hydergin^R-Ampullenlösung (Deklaration: 0,3 mg / 1 ml Gesamtalkaloid) wurde mit Wasser auf eine Konzentration von 3 mg / 100 ml gebracht. Die Kurven der UV-Absorptionsspektren beider Produkte zeigten einen identischen Verlauf.
Hauptmaxima: Dihydroergotoxinmethansulfonat 280 nm (0,26) und Hydergin^R 280 nm (0,26), Abb. 77.

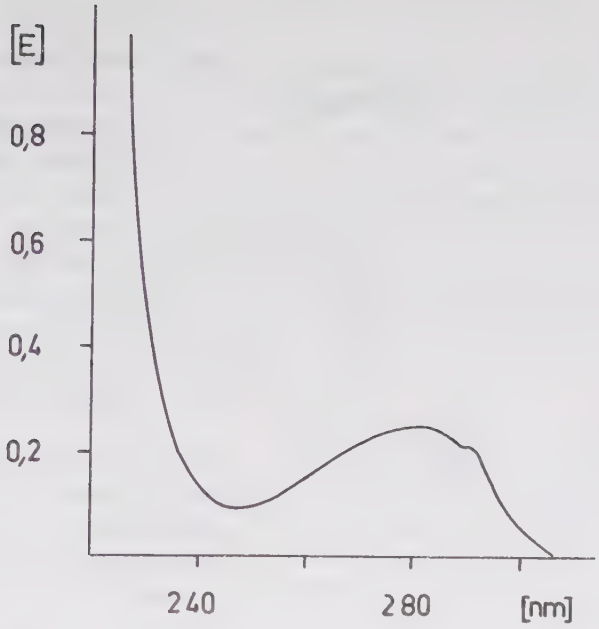


Abb. 77: Gleicher Verlauf der UV-Absorptionskurven. Lösungen: Hydergin^{R}-Ampullen (3 mg / 100 ml), mit Wasser eingestellt und wässrige Lösung der Probe Dihydroergotoxinmethansulfonat (3 mg / 100 ml).

2.) Die freien Basen wurden aus den wässrigen Lösungen durch Zugabe von Ammoniak unter Stickstoffatmosphäre mit Chloroform ausgeschüttelt und chromatographiert.

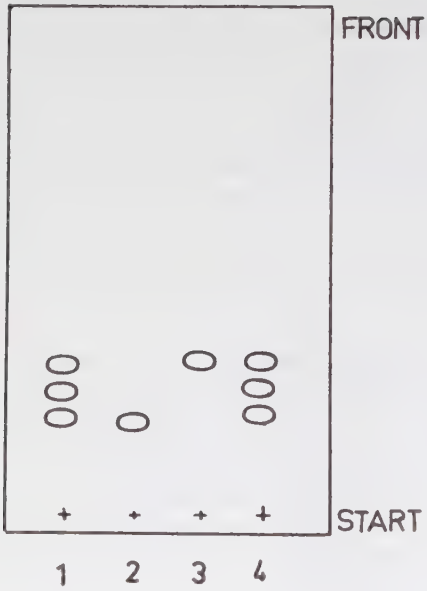


Abb. 78: Chromatogramm der freien Basen.

(1) = Dihydroergotoxin (aus Dihydroergotoxinmethansulfonat).
(2) = Dihydroergocristin
(3) = Dihydroergokryptin
(4) = Dihydroergotoxin (aus Hydergin^{R}-Ampullen).

Mobile Phase: n-Heptan 65 + Essigsäureäthylester 30 + Diäthylamin 5.
Adsorbens: Zellulose F_{254} (Merck)
Formamid imprägniert
Laufhöhe: 15 cm

Fließmittelkombinationen zur Trennung der Zersetzungsprodukte.

Die Zersetzungsprodukte der Alkaloide nach Sonnenlichteinwirkung wurden mit dem Fließmittel Chloroform 90, Äthanol 10 und n-Heptan 5, nach dem Erhitzen mit Diäthylamin 60 und n-Heptan 40 und die Alkaloidsalze mit Diäthylamin 60 und Cyclohexan 40 chromatographiert. Die Laufhöhe betrug 12,5 cm bzw. 10 cm.

Quantitative Bestimmung des Restalkaloids.

Die methanolischen Lösungen des Dihydroergocristins und die wässrigen Lösungen des Dihydroergotoxinmethansulfonats wurden in der Konzentration von 3 mg / 10 ml in Ampullen aus weißem Glas für die Sonnenlichtbestrahlung und in Ampullen aus braunem Glas zur Hitzebehandlung abgefüllt. Sie wurden 96 h behandelt. Für jede Bestimmung wurde zusätzlich eine Eichkurve erstellt. Die reinen Alkaloide wurden in γ -Mengen aufgetragen. Aus den Lösungen der Zersetzungsprodukte wurden die aufgetragenen Mengen so gewählt, daß möglichst noch vom Schreiber des Spektralphotometers nach starker Belastung eine sichtbare Ortskurve aufgezeichnet wurde.

Das Restalkaloid wurde mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt (s. Abb. 78). Die Prozentzahl gibt an, wieviel unzersetztes Alkaloid gemessen am reinen, mit aufgetragenen Alkaloid noch erhalten war.

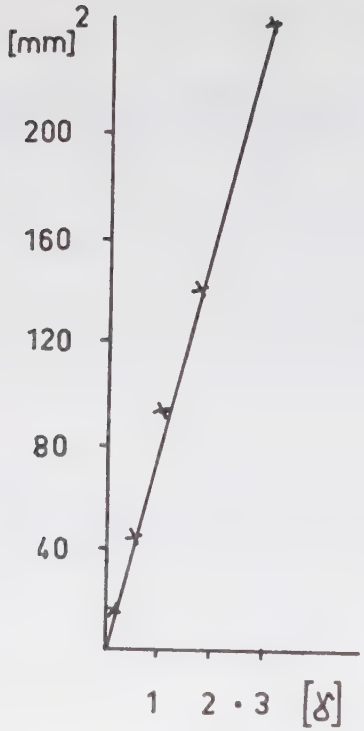


Abb. 79: Eichkurve für Dihydroergocristin.

Alle aufgestellten Eichkurven ergaben Geraden.

1.) Zersetzung im Sonnenlicht

a) Dihydroergocristin 3 mg / 10 ml Methanol

Art der Zersetzung:	Sonnenlicht 96 h
Aufgetragene Gesamtmenge:	6 γ aus methanolischer Lösung
Maximum des UV-Spektrums:	265 - 70 nm
Anzahl der Zersetzungsflecke:	2
Menge an Restalkaloid:	gemessene Fläche = 45 mm^2 = 0,6 γ ; entspricht 10 proz. Restalkaloid.

b) Dihydroergotoxinmethansulfonat, Hydergin^{R}
3 mg / 10 ml H_2O.

Art der Zersetzung:	Sonnenlicht 96 h
Aufgetragene Gesamtmenge:	5,1 γ aus wässriger Lösung
Maxima der UV-Spektren:	Dihydroergotoxinmethansulfonat: 265 nm, Hydergin^{R}: 267 nm
Anzahl der Zersetzungsflecke:	4
Menge an Restalkaloid:	nicht meßbare Fläche bei 285 nm, entspricht weniger als 1 proz. Restalkaloid.

2.) Zersetzung im Tageslicht

a) Dihydroergocristin 3 mg / 10 ml Methanol

Art der Zersetzung:	Tageslicht 96 h
Aufgetragene Gesamtmenge:	2,4 γ aus methanolischer Lösung
Anzahl der Zersetzungsflecke:	---
Menge an Restalkaloid:	gemessene Fläche = 285 mm^2 = 2,4 γ, entspricht 100 proz. Alkaloid

b) Dihydroergotoxinmethansulfonat und Hydergin^{R}
3 mg / 10 ml H_2O

Art der Zersetzung:	Tageslicht 96 h
Aufgetragene Gesamtmenge:	2,4 γ aus wässriger Lösung
Anzahl der Zersetzungsflecke:	1
Menge an Restalkaloid:	gemessene Fläche = 179 mm^2 (Hydergin^{R}) und 183 mm^2 (Dihydroergotoxinmethansulfonat) entspricht 50 - 60 proz. unzersetztem Alkaloid.

3.) Zersetzung nach dem Erhitzen bei 100 °

a) Dihydroergocristin 3 mg / 10 ml Methanol

Art der Zersetzung:	Hitze 100 °, 96 h
Aufgetragene Gesamtmenge:	3 γ aus methanolischer Lösung
Maximum des UV-Spektrums:	280 nm
Anzahl der Zersetzungsflecke:	3
Menge an Restalkaloid:	gemessene Fläche = 275 mm^2 = 2,2 γ ; entspricht 75 proz. Restalkaloid.

b) Dihydroergotoxinmethansulfonat, Hydergin^R
3 mg / 10 ml H_2O

Art der Zersetzung:	Hitze 100 °, 2 x 96 h
Aufgetragene Gesamtmenge:	3,6 γ aus wässriger Lösung
Maxima der UV-Spektren:	Dihydroergotoxinmethansulfonat: 256 nm, Hydergin^R: 269 nm
Anzahl der Zersetzungsflecke:	3
Menge an Restalkaloid:	gemessene Fläche 46 mm^2 (Hydergin^R); entspricht 25 proz. unzersetztem Alkaloid. Dihydroergotoxinmethansulfonat (weniger als 1 proz.)

Bestimmung der Zersetzungsprodukte des Dihydroergotoxinmethansulfonats nach Sonnenlichteinwirkung.

Für die einzelnen Ortskurven wurden folgende Flächen gemessen:

Fleck: 1, Maximum	265 nm,	Fl. 63 mm^2
2, Maximum	236 nm,	Fl. 222 mm^2
3, Maximum	240 nm,	Fl. 22 mm^2
4, Maximum	240 nm,	Fl. 22 mm^2
		Fl. 329 mm^2

Die angegebenen Flächenwerte gelten für aufgetragene 2,4 γ Alkaloidsalz aus einer Lösung von 3 mg / 10 ml H_2O. Aus der Summe dieser Flächen ergeben sich 329 mm^2. Die Fläche eines mitgelaufenen, reinen Alkaloidsalzes, das ebenfalls in einer Menge von 2,4 γ aufgetragen wurde, betrug 365 mm^2.

Behandlung der sauerstoffhaltigen und der sauerstoffreien Lösung.

Zur Entfernung des Sauerstoffs wurden die methanolischen Lösungen des Dihydroergocristins und die wässrigen Lösungen des Dihydroergotoxinmethansulfonats in den braunen bzw. weißen Ampullen mit Stickstoff begast und direkt zugeschmolzen. Anschliessend wurden sie 24 h, 48 h und 96 h der Hitze von 100 ^{o} bzw. dem Tageslicht eines Raumes ausgesetzt. Die Konzentration der Lösungen betrug 3 mg / 10 ml.

Isolierung des Zersetzungsproduktes des Dihydroergotamins nach Sonnenlichtbestrahlung mit Hilfe präparativer DC.

500 mg Dihydroergotaminmethansulfonat wurden in 1 l bidestilliertem Wasser gelöst und anschließend in einem Kolben aus farblosem Glas dem Sonnenlicht ausgesetzt (Zeit : 15 Tage). Die schwach saure, wässrige Lösung (pH 6) wurde mit 5 x 100 ml Chloroform (p. A.) ausgeschüttelt. Der bräunlich gefärbte Eindampfungsrückstand wurde in wenigen ml Äthanol aufgenommen und chromatographisch mit dem Fließmittel n-Heptan 5, Äthanol 10 und Chloroform 90 auf präparativen Kieselgelplatten F_{254} gereinigt. Am Startpunkt blieb eine starke, gelbe Zone, während das Zersetzungsprodukt wanderte und durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sichtbar wurde. Anschließend wurde es vom Kieselgel mit Äthanol eluiert. Diese Arbeiten wurden bei Raumtemperatur

ausgeführt. Aus 1,0 g Dihydroergotaminmethansulfonat wurden 49,0 mg Zersetzungsprodukt isoliert. Nach einer nochmaligen präparativen Trennung gleichen Systems wurden 47 mg eines hellgelben Pulvers erhalten.

Präparative Aufarbeitung der Zersetzungsprodukte des Dihydroergocristins nach dem Erhitzen auf 100 °.

1,0 g Dihydroergocristin wurde in 250 ml Methanol (p. A.) gelöst und so lange im Trockenschrank in Ampullen aus braunem Glas bei 100 ° erhitzt, bis sich die Zersetzungsprodukte Z_1, Z_2 und Z_3 ausreichend gebildet hatten (Zeit etwa 3 Wochen).

Nach der Trennung auf präparativen Kieselgel-Platten F_{254} (Merck) mit dem Fließmittel n-Heptan 40 und Diäthylamin 60 wurden die Zersetzungsprodukte mit Methanol und Chloroform vom Adsorbens gelöst. Nach dem Erhitzen war die methanolische Lösung gelb - braun gefärbt; dadurch wurde die präparative Aufarbeitung des Zersetzungsproduktes stark beeinflußt; denn ein Teil dieser Verunreinigungen (wahrscheinlich Polymerisate des Indols) überzog die Fläche des Adsorbens. Nach dieser präparativen Trennung fielen 120 mg Z_2 (Dihydrolysergsäureamid) nach dem Umkristallisieren in Methanol an.

Mit der mobilen Phase Ameisensäuremethylester 40, Butanol 40 und verdünnter Essigsäure 20 wurden die gelblichen Rückstände der Zersetzungsprodukte Z_1 und Z_3 aus der ersten Trennung noch einmal auf dem gleichen Adsorbens aufgearbeitet. Nach dem Umkristallisieren in Wasser wurden 100 mg Dihydrolysergsäure (Z_1) als weißes Pulver erhalten.

Z_3 wurde ebenfalls isoliert und in einem nochmaligen Reinigungsschritt mit Diäthylamin 60, n-Heptan 40 vom restlichen Peptidalkaloid befreit. Es fielen 15 mg eines schwach hellgelben Pulvers an.

Dieses Produkt wurde noch einmal auf Kieselgel F_{254} (Merck) mit der mobilen Phase Dioxan-Aceton (1 : 1) nachgereinigt. Weitere gelbe Zonen setzten sich am Start und an der Front ab. Schließlich fielen 3,2 mg eines nahezu weißen Pulvers an.

^{13}C-NMR-Spektren

Zur Aufnahme der ^{13}C-NMR-Spektren wurden Lösungen in $(CD_3)_2 SO$ (Dihydroergotamin, Ergobasin und Zersetzungsprodukt Z_s) bei einer Konzentration von 90 mg Dihydroergotamin / ml, 100 mg Ergobasin / ml und 47 mg Zersetzungsprodukt / ml als Proben verwendet. Die ^{13}C-chemischen Verschiebungen wurden gegen die Lösungsmittelsignale gemessen und auf Tetramethylsilan umgerechnet ($\delta_{TMS} = \delta_{(CD_3)_2 CO} - 39.8$ ppm).

Die protonen-breitbandentkoppelten Impuls-Fourier-Transform-^{13}C-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker HFX-90-Multikern-NMR-Spektrometer gemessen (Meßkanal: 22,628 MHz für ^{13}C; Entkopplungskanal: 90 MHz für ^{1}H; Stabilisationskanal: 13 MHz für ^{2}H). Die Impulsbreite betrug 4 - 5 usek für die zur Messung notwendigen 90 ^{o} - Impulse. Die Meßzeit pro Interferogramm betrug 0,4 sek.. Es wurden je nach Konzentration zwischen 16000 und 110000 Interferogramme zur Verbesserung der Empfindlichkeit in einem Fabritek-1074-Rechner (4 K / 9 Bit) akkumuliert. Die akkumulierten Interferogramme wurden mit einem DEC-PDP-8-I-Rechner (8 K, 9 Bit) zu den NMR-Spektren Fourier-transformiert. Aus den digital entnommenen Adressendifferenzen wurden die ^{13}C-chemischen Verschiebungen maschinell auf $\pm$ 0,1 ppm genau berechnet.

Maxima und Minima des Indols, der Dihydrolysergsäure, des Dihydroergotamins und des Dihydroergocristins.

	Indol	Dihydrolysergsäure	Dihydroergotamin	Dihydroergocristin
Maximum:	276 (5977) 271 (6206)	280 - 81 (6334)	281 (6563)	281 (6471)
Nebenmaximum:	287 (4960)	292 (5228)	291 (5422)	291 (5356)
Minimum:	238 (1501)	242 - 44 (1782)	246 (1764)	246 (1808)
Nebenminimum:	285 (3879)	290 (5110)	289 (5227)	289 (5166)

Maxima und Minima des Dihydroergotaminmethansulfonats, des Dihydroergotamins und des Zersetzungsproduktes Z_s:

Dihydroergotaminmethansulfonat 8 mg / 100 ml Chloroform
Maxima: 280 nm (0,47), 291 nm (0,37), 240 nm (0,41);
Minima: 250 nm (0,26), 289 nm (0,36).

Dihydroergotamin 4,5 mg / 100 ml Methanol
Maxima: 281 nm (0,51), 291 nm (0,42), 225 nm (2,0);
Minima: 246 nm (0,136), 289 nm (0,40).

Zersetzungsprodukt Z_s 4,7 mg / 100 ml Methanol
Maxima: 333-35 nm (0,355), 265 nm (0,75),
232-35 nm (1,89), 212-16 nm (1,85);
Minima: 290 nm (0,15), 255 nm (0,66), 225 nm (1,67).

Maximum und Minimum des Dihydrolysergsäureamids:

Maximum: 280 nm (6696), Minimum: 245 nm (1711);
gemessen in Methanol.

Übersicht charakteristischer IR-Schwingungen einiger Mutterkornalkaloide mittlerer und niedriger Frequenzen.

Skala:	1550	1350	1150	950	750 cm^{-1}
Dihydro-lysergsäure	1450 (m)	1400 - 1350 (Quardruplett)			790 / 770 (Dublett)
Lysergid	1460				780 / 740 (Dublett)
Dihydro-Lysergsäure-amid		1430			740
Dihydroergo-cristin	1500	1440	1220		760
Ergocristin	1530	1410	1210 (m)		730
Ergokryptin	1530	1430	1190 (m)		760 / 740 (Dublett)

Eine Übersicht charakteristischer, starker bis mittelstarker Banden der abgebildeten Spektren soll zeigen, in welchen Bereichen sich die Alkaloide hauptsächlich unterscheiden bzw. übereinstimmen. Man erkennt deutlich einen Unterschied zwischen 790 cm^{-1} und 730 cm^{-1}, sowie das Fehlen der Bande um 1200 cm^{-1} der Peptidalkaloide bei den Spaltprodukten Dihydrolysergsäure, Dihydrolysergsäureamid und bei Lysergid.

Berechnung des Deuterisierungsgrades des Dihydrolysergsäureamids im Molekül Dihydroergocristin [20].

Dihydrolysergsäureamid, Summenformel: $C_{16} H_{19} N_3 O$

Massenspektrum: M^+ 269

Gemessen an $\frac{m}{e}$ = 271 (Int. 100 proz.) mit Gerber variable Scale wurden folgende Werte ermittelt:

M^+ = 20 proz. (= Anteil des natürlichen Isotops in $M^+ + 1$)
$M^+ + 1$ = 44 proz. ($\frac{m}{e}$ = 270)

$M^+ + 2$ = 39 proz. ($\frac{m}{e}$ = 271)

$M^+ + 3$ = 19 proz. ($\frac{m}{e}$ = 272)

$M^+ + 4$ = 8 proz. ($\frac{m}{e}$ = 273)

Korrektur der Werte:

$M^+ + 1$ = (C x 1,1) + (N x 0,4) = 17,6 + 1,2 = 18,8 proz.
(C = Anzahl der C-Atome, N = Anzahl der N-Atome).

---

20) H. Budzikiewicz, Massenspektrometrie, Verlag Chemie, Weinheim 1972

20 proz. 0,188 = 3,76 proz. (natürlicher Anteil von M^+ an $M^+ + 1$)

$M^+ + 1$: 44,00
- 3,76

40,24 proz. korrigierter Wert für $M^+ + 1$.

40,24 x 0,188 = 7,56 proz. (Anteil von $M^+ + 1$ in $M^+ + 2$)

$M^+ + 2$: 39,00
- 7,56

31,44 proz. korrigierter Wert für $M^+ + 2$.

31,44 x 0,188 = 5,91 proz. (Anteil von $M^+ + 2$ in $M^+ + 3$)

$M^+ + 3$: 19,00
- 5,91

13,09 proz. korrigierter Wert für $M^+ + 3$.

13,09 x 0,188 = 2,45 proz. (Anteil von $M^+ + 3$ in $M^+ + 4$)

M^+	20 proz.	(20 / 110,32) x 100	= 18,1 proz.	d_0
$M^+ + 1$	40,24 proz.	(40,24 / 110,32) x 100	= 36,5 proz.	d_1
$M^+ + 2$	31,44 proz.	(31,44 / 110,32) x 100	= 28,5 proz.	d_2
$M^+ + 3$	13,09 proz.	(13,09 / 110,32) x 100	= 11,85 proz.	d_3
$M^+ + 4$	5,55 proz.	(5,55 / 110,32) x 100	= 5,03 proz.	d_4
	110,32 proz.			

Qualitative und quantitative Analyse der Hydergin^{R}-Tropfen.

Bestimmung des Äthanolgehaltes:

Gaschromatograph:	Multifract F 40, Perkin Elmer;
Säule:	62 S 12 - 14;
Beschichtung:	Carbowachs;
Gasdruck:	Luft 1,0 kp / cm^2, N_2 1,2 kp / cm^2, H_2 1,3 kp / cm^2;
Wasserbadtemperatur:	60 °;
Injektionstemperatur:	130 - 140 °;
Ofentemperatur:	75 °;
Empfindlichkeit:	128 °;
Injektionszeit:	3 Min.;
Analysenzeit:	4 Min.;
Blasen:	0,2 Min.;
Papiergeschwindigkeit:	600 mm / Min.;
Innerer Standard:	tert. Butanol 1 p. m.

Berechnung für drei Werte: $\frac{h\ (\text{Peak Äthanol})}{h\ (\text{Peak tert. Butanol})}$ gemessen in mV, multipliziert mit dem Faktor 0,3627 ergibt den Promille-Gehalt.

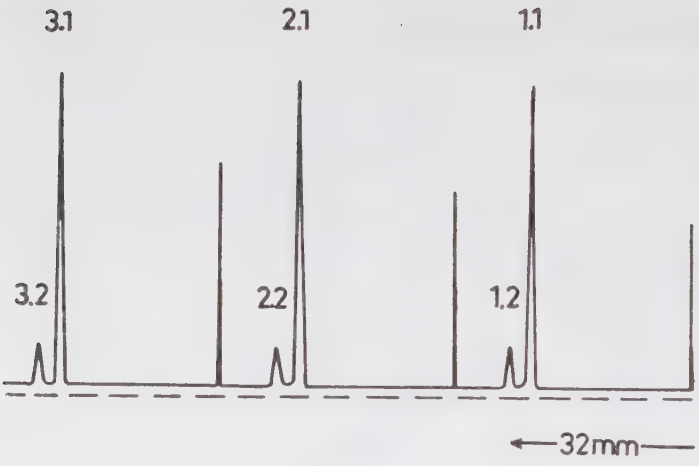


Abb. 80: Tert. Butanol 1.1 = 7,4 mV, 2.1 = 7,7 mV,
3.1 = 7,7 mV;
Äthanol 1.2 = 1,0 mV, 2.2 = 1,0 mV,
3.2 = 1,1 mV.
Verdünnung der Hydergin^{R}-Lsg. 1 : 1000.

Daraus ergibt sich folgender Gehalt an Äthanol:
1. Messung: 0,47 p. m., 2. Messung: 0,46 p. m.,
3. Messung: 0,50 p. m.
Der Mittelwert beträgt 0,48 p. m.;
Äthanolgehalt in Hydergin^{R}-Tropfenlösung = 4,8 proz.

Bestimmung des Glyceringehaltes:

Alle Bestimmungen wurden nach den DGF-Einheitsmethoden, Abteilung E-Glycerin (1950 - 65) durchgeführt.

Nachweise: Nach der Destillation der Hydergin^{R}-Tropfenlösung wurde der Rückstand geprüft:
Löslichkeit von Jod: Einige ml der Probe werden mit einem Körnchen Jod geschüttelt. Glycerin löst Jod nicht, deshalb entsteht keine Färbung.

Farbreaktion mit Pyrogallol-Schwefelsäure: 0,1 ml der Probe werden mit 2 ml Wasser vermischt und vorsichtig mit 3 ml einer 5 proz. Lösung von Pyrogallol in konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. Glycerin erzeugt eine tiefrote Färbung, die beim Verdünnen mit 5 ml Wasser in kirschrot übergeht.

Quantitative Bestimmung: Modifizierte Perjodat-Methode, azidimetrische Bestimmung:
Erforderliche Lösungen: 0,5 n Schwefelsäure, wässrige Propylenglykol-Lösung, 50 proz., Bromkresolpurpur-Lösung, 0,1 n Natronlauge.
Zur Herstellung der Kalium-di-meso-perjodat-Lösung in einem Meßkolben von 1 Ltr. Inhalt gibt man 240 ml 1 n karbonatfreie Kalilauge und 560 ml Wasser. Sodann setzt man 46 g Kaliumperjodat zu. Man löst unter schwachem Erwärmen. Nach Abkühlen auf die Eichtemperatur des Kolbens wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung verwahrt man in einer braunen Glasflasche mit eingeschliffenem Stopfen.

Ausführung der Bestimmung: Eine etwa 0,4 g Glycerin entsprechende Menge der Probe (für Hydergin^{R}-Tropfen ca. 2,2 g) wird genau eingewogen und in einem Erlenmeyer-Kolben von 500 ml Inhalt mit soviel destilliertem Wasser versetzt, bis das Volumen etwa 50 ml beträgt. Mit Hilfe von Pipetten werden bei 20 ^{o} genau

25 ml 0,5 n Schwefelsäure und sodann 50 ml Perjodat zugegeben. Nach dem Umschwenken bleibt die Lösung 5 Minuten stehen. Darauf fügt man 10 ml wässriges, 50 proz. Propylenglykol hinzu und titriert nach Umschütteln mit 0,1 n Natronlauge unter Verwendung von Bromkresolpurpur als Indikator. Zur Ermittlung des Blindwertes der Perjodatlösung werden 25 ml 0,5 n Schwefelsäure zu 100 ml Wasser gegeben, das 5 g Propylenglykol enthält. Man fügt 50 ml der Perjodatlösung hinzu und läßt nach Umschwenken 5 Minuten stehen. Darauf wird mit 0,1 n Natronlauge unter Verwendung von Bromkresolpurpur als Indikator titriert. Hierbei verbraucht man 5,1 - 5,3 ml Natronlauge, die bei der Berechnung zu berücksichtigen sind. Desgleichen wurde der Blindwert für eine Lösung ermittelt, die außer Glycerin alle Komponenten der Hydergin^{R}-Tropfenlösung enthielt und daher ebenfalls schwach sauer war (pH 4,3). Es ergab sich kein Unterschied im Verbrauch der 0,1 n Natronlauge gegenüber der Ermittlung des Blindwertes der Perjodatlösung alleine.

Ermittlung des Blindwertes a) für die Perjodatlösung:
Verbrauch an 0,1 n Na OH: 5,1 ml, 5,2 ml, 5,1 ml, 5,1 ml, 5,1 ml;
b) für die Perjodat- und Vergleichslösung (pH 4,3) entsprechend Hydergin^{R} ohne Glycerinzusatz:
Verbrauch an 0,1 n Na OH: 5,2 ml, 5,2 ml, 5,3 ml, 5,3 ml, 5,3 ml.
Der Blindwert wurde auf 5,3 ml 0,1 n Na OH festgesetzt.
Berechnung: % Glycerin = $\frac{(a - b) \times N \times 9{,}209}{E}$

a = verbrauchte ml Natronlauge für den Hauptversuch
b = verbrauchte ml Natronlauge für den Blindversuch
N = Normalität der Lauge
E = Einwaage in g

Verbrauch an 0,1 n Na OH im Hauptversuch:
1. 41,5 ml (E = 2,2445 g) = 14,8 % Glycerin
2. 40,8 ml (E = 2,2211 g) = 14,7 % Glycerin
3. 41,1 ml (E = 2,2301 g) = 14,8 % Glycerin
4. 39,7 ml (E = 2,2182 g) = 14,6 % Glycerin
5. 41,7 ml (E = 2,2502 g) = 14,9 % Glycerin

Blindversuche bei gleichen Einwaagen bestätigen die Ergebnisse.

Bestimmung des Wassergehaltes:

Der Wassergehalt wurde nach Karl Fischer titriert und der Endpunkt elektrometrisch mit Hilfe der Dead-Stop-Titration festgestellt (Methrohm-Karl-Fischer-Titration mit Handbüretten). Der Wirkungswert für $Cu\ SO_4 \times 5\ H_2O$ betrug bei Vorlage von 151,6 mg $Cu\ SO_4 \times 5\ H_2O$:

$$\frac{54{,}6459\ (\text{ mg } H_2O \text{ in } 151{,}6 \text{ mg } Cu\ SO_4 \cdot 5\ H_2O)}{6{,}16\ (\text{ ml Verbrauch an KF I bei Vorlage von } 10 \text{ ml KF II})} =$$

8,8711 mg H_2O / 1 ml (= Wirkungswert).

Vorlage Hydergin^R	Verbrauch an KF I	Wassergehalt in %
187,4811 mg	17,4 ml	82 %
192,4887 mg	17,5 ml	81,5 %

Bestimmung des pH-Wertes und der Methansulfonsäure:

Der pH-Wert der Originallösung und der Vergleichslösungen wurde mit einem Potentiometer E 336 (Metrohm) bestimmt. Dazu wurde der pH-Wert einer Vergleichslösung von 1 mg Dihydroergotoxinmethansulfonat / 1 ml Lösungsmittel der Zusammensetzung der Hydergin^R-Tropfenlösung ohne Säurezusatz gemessen. Alkaloidlösung ohne Säurezusatz: pH 5,4. Anschließend wurde solange 0,01 n Methansulfonsäure zugetropft, bis der pH der Hydergin^R-Tropfenlösung von 4,3 erreicht war. Dazu sind für 100 ml Lösung 1,52 ml 0,01 n Methansulfonsäure nötig.

Abbau der stabilisierten Lösungen bei 100 °.

Als Adsorbens dienten Kieselgel F_{254} (Merck)-Platten, die Laufhöhe des Fließmittels Diäthylamin 60 und Cyclohexan 40 betrug bei einer Laufzeit von 30 Minuten 10 cm. Auf das gleiche

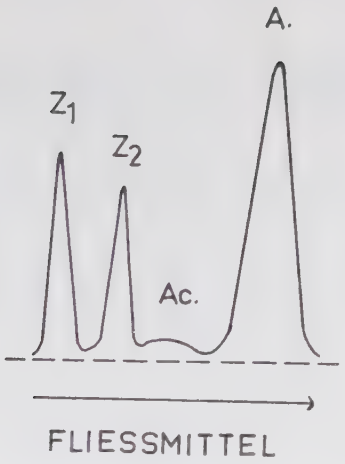
Adsorbens wurde eine Eichkurve des verwendeten Alkaloidsalzes (Dihydroergotoxinmethansulfonat) in der jeweiligen Zubereitung, sowie je eine Eichkurve der Zersetzungsprodukte Dihydrolysergsäureamid und Dihydrolysergsäure aufgetragen. Die Säure wurde in Pyridin (3 mg / 25 ml) und das Amid in Methanol (3 mg / 25 ml) gelöst. Die glycerinhaltigen Zubereitungen der Alkaloidsalze hatten folgende Zusammensetzung: Wasser 16 T, Glycerin 3 T und 95 proz. Äthanol 1 T; die Konzentration des Alkaloidsalzes betrug 1 mg / 1 ml, die Lösungen wurden durch Zusatz (außer Hydergin^{R}-Tropfen, pH 4,3) von 0,01 n Methansulfonsäure auf pH 4,3 eingestellt; die glycerinfreie Lösung enthielt bei gleicher Alkaloidkonzentration und pH-Wert 19 T Wasser und 1 T 95 proz. Äthanol. Zur Herstellung der Lösungen wurden die Alkaloide in 95 proz. Äthanol gelöst und dann mit Wasser bzw. Glycerin aufgefüllt.

Aufgetragen wurde mit einer Hamiltonspritze 10 nl im abgedunkelten Raumlicht, die Säure und das Amid wurden zu 0,05 bis 2,4 γ und die Alkaloidsalze von 0,5 bis 2,4 γ aufgetragen. Der Durchmesser der Startflecke betrug nicht mehr als 2 mm.

Die spektralphotometrische Messung wurde unter Fluoreszenzminderung bei 284 nm vorgenommen.

Zur quantitativen Bestimmung der abgebauten Alkaloide und der Zersetzungsprodukte Z_1 und Z_2 wurden aus den auf das gleiche Adsorbens mit aufgetragenen reinen Vergleichsprodukten Eichkurven aufgestellt (Abscisse : Menge in γ ; Ordinate: Flächen in mm^2) und über die erhaltenen Flächen nach der Belastung die γ-Mengen abgelesen. Die Flächen wurden aus dem Produkt Halbwertsbreite x Höhe berechnet.

Die Rf-Werte der Produkte betrugen bei einer Laufhöhe von 10 cm: $Z_1 = 0$, $Z_2 = 0,1$, Aciprodukt = 0,2 und Alkaloid = 0,4.



Obige Abbildung zeigt die Auflösung der völlig getrennten Produkte (Beispiel: Messung nach 55 h, Lösung ohne Glycerin).

Z_1 = Dihydrolysergsäure
Z_2 = Dihydrolysergsäureamid
Ac. = Aciprodukt
A. = unzersetztes Alkaloid

Anteile an Dihydrolysergsäureamid, Dihydrolysergsäure und weiterer Zersetzungsprodukte beim Erhitzen auf 100 °.

Zubereitung	Dihydrolysergsäureamid			Dihydrolysergsäure			Weitere Zers.-Prod. *		
	30h	55h	105h	30h	55h	105h	30h	55h	105h
Hydergin^{R}-Tropfen	5%	6%	10%	5%	6,2%	10%	20%	20%	39%
Zubereitung entsprechend Hydergin^{R}-Tropfenlösung	5%	6%	10%	5%	6,2%	10%	20%	20%	39%
Zubereitung ohne Glycerin	5,4%	7,1%	10%	5,8%	8,3%	10%	12%	22%	39%

* Zersetzungsprodukte:

Die Prozentangaben sind theoretisch aus der Differenz an Verlust des Gesamtalkaloids und der Summe aus Dihydrolysergsäure und Dihydrolysergsäureamid ermittelt. Sie enthalten auch den abgespaltenen Peptidteil. Er entspricht der Summe der Hydrolyseprodukte Dihydrolysergsäure und Dihydrolysergsäureamid.

L e b e n s l a u f

Am 2. Mai 1944 wurde ich, Axel Walter, als Sohn des Apothekers Josef Walter und seiner Ehefrau Heinke, geb. Scheel, in Marne geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1951 bis 1955 in Brunsbüttel. 1955 wechselte ich auf das Gymnasium in Marne und verbrachte ab 1962 die letzten Jahre bis zum Abitur 1965 auf dem Landerziehungsheim Stiftung Louisenlund.
Im Sommer 1965 studierte ich ein Semester Chemie und Botanik an der Universität Hamburg. Ende 1965 begann ich mit dem Praktikum in der Krankenhausapotheke Hamburg-Rissen und schloß es nach dem zweiten Praktikumsjahr in der Goethe-Apotheke in Hamburg-Altona mit der Pharmazeutischen Vorprüfung ab. Das Pharmaziestudium nahm ich 1968 in Tübingen auf, wo ich im Wintersemester 1971/72 die Pharmazeutische Prüfung vor dem Prüfungsausschuß in Tübingen ablegte.
Im Mai 1972 heiratete ich Fräulein Gudrun Liese.

Nach verschiedenen Apothekenvertretungen begann ich im September 1972 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff im Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen mit der Dissertation " Analytik und Stabilität hydrierter Mutterkornalkaloide ", die ich im Oktober 1974 abschloß. Ab November 1972 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft am gleichen Institut.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H. Auterhoff waren die Herren Professoren und Dozenten:
E. Graf, F. Moll, K. A. Kovar (Pharmazie)
W. Rüdorff (Anorg. Chemie)
E. Müller, P. Rosenmund (Org. Chemie)
E. Reinhard (Pharmakognosie)
R. E. Bader (Hygiene)
H. Krüger (Physik)